

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Anatomía Patológica



Citomegalovirus en trasplante hepático.
Epidemiología, histopatología, inmunohistoquímica e
hibridación in situ

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Norma Thome Juca

Directores

Francisco Colina Ruiz-Delgado

Juliana Fariña González

Madrid 2004

ISBN: 978-84-8466-990-6

© Norma Thome Juca, 1993

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
HOSPITAL UNIVERSITARIO "12 DE OCTUBRE"
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLOGICA

CITOMEGALOVIRUS EN TRASPLANTE HEPATICO.
EPIDEMIOLOGIA, HISTOPATOLOGIA, INMUNOHISTOQUIMICA
E HIBRIDACION IN SITU.

Norma Thomé Jucá
MADRID, 1993.

DIRECTORES: PROF.DR. FRANCISCO COLINA RUIZDELGADO
PROF.DR. JULIANA FARIÑA GONZALEZ

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

Consideramos que el trabajo denominado, "Efectos
gástricos en trasplante hepático. Epidemiología, histopatolo-
gía, inmunohistoquímica e inmunología in situ", realizado
por Dña Norma Thome, que bajo nuestra dirección cumplió
los requisitos académicos para su defensa pública
y conseguir el grado de Doctor.

Vº Bº
EL TUTOR (2)

Atanxia

Fdo.: _____

(fecha y firma)

D.N.I.:

El Director de la Tesis

Atanxia x.

Colina R

Fdo.: _____

(fecha y firma)

D.N.I.: 15.159.373
8728657

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

favorable

23-VI-1993

Fecha reunión
Consejo Departamento

El Director del Departamento

W

Fdo.: _____

(fecha y firma)

A mis padres y hermanos.

A Eduardo.

AGRADECIMIENTOS

. Quiero expresar mi reconocimiento y gratitud a todos los que constituyen científica y administrativamente la **Universidad Federal de Pernambuco (Brasil)**, y particularmente a mis compañeros de trabajo del Departamento de Patología y del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico/UFPe, que han permitido mi estancia en Madrid para realizar el curso de doctorado y que durante este periodo han realizado mis actividades docentes y asistenciales.

. La realización de este programa de doctorado no hubiera sido posible sin la concesión de una beca por el **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) de Brasil.

. Realizar una tesis es una labor que exige determinación de hacerla, entusiasmo con el tema, apoyo técnico-científico y una dirección segura y eficaz en sus momentos claves. En este sentido, el **Dr. Francisco Colina Ruizdelgado**, ha sido un director con estos requisitos fundamentales y que me ha ofrecido su determinación para completar esta tarea, su entusiasmo por el estudio de la patología hepática, y con quién, la convivencia me ha permitido construir una gran amistad.

. El contacto académico con los profesores del Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad Complutense de Madrid ha sido fundamental para realizar este estudio. En este sentido expreso mi agradecimiento especialmente a la **Prof. Juliana Fariña Gonzalez**, también director de esta tesis, por su continuo apoyo y asesoramiento.

. Mi agradecimiento al **Prof. Francisco José Martínez Tello**, Jefe de Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario "12 de Octubre" de Madrid, por su ayuda y facilidades para realizar nuestro estudio en dicho departamento.

. De igual forma, mi agradecimiento al **Dr. Claudio Ballestín Carcavilla** por haberme ofrecido sus conocimientos de inmunohistoquímica e hibridación in situ y orientado en la larga fase experimental de este trabajo.

. Quiero expresar mi gratitud a todos los miembros de los

distintos Servicios del Hospital "12 de Octubre" que colaboran en el programa de Trasplante Hepático encabezado por el **Prof. Enrique Moreno González** y a todos sus colaboradores, en especial a los **Dres. Ramón Gómez, Rafael Delgado, Carlos Lumbreras y Joaquin Otero**, por toda la información que me han ofrecido en relación con los datos clínicos de los pacientes.

. La ayuda técnico-científica de **D. Pedro Cuesta** del Centro de Proceso de Datos de la Universidad Complutense de Madrid, durante el análisis estadístico que realizamos, nos ha permitido una mayor comprensión de los resultados de nuestro estudio.

. Quisiera agradecer también al **Dr. Manuel Nevado** por su paciencia y ayuda en las diferentes etapas de este estudio.

. Mi agradecimiento a **Dña. Belén Fernández Pérez**, por el hábil y laborioso trabajo que ha realizado en la ejecución de los numerosos cortes histológicos necesarios para el estudio inmunohistoquímico y de hibridación in situ.

. La ayuda técnica ha sido facilitada por **D. Manuel Garrido Rodríguez** y **D. José Ramón Rodríguez Sotelo** que amablemente han estado siempre dispuesto a transmitir su experiencia y conocimiento en esta actividad de laboratorio.

. La realización de este trabajo tampoco hubiera sido posible si no hubiera contado siempre con el apoyo y amistad de **mis compañeros del Hospital "12 de Octubre" de Madrid**. La solidaridad que me han demostrado durante mi estancia en ese departamento a lo largo del tiempo, me ha permitido consolidar verdaderas amistades y sentirme como un miembro más de este departamento.

. Y para finalizar, quisiera agradecer a **Luiz, Bruno, Clarisse, Joao y Maira** por su continuo apoyo e interés por nuestro trabajo, durante el periodo que vivimos en España.

INDICE

- INTRODUCCION	1
 I - EL CITOMEGALOVIRUS HUMANO (CMV)	
I.A) Historia del Citomegalovirus	5
I.B) Biología y Patogenía del CMV	7
I.C) Historia Natural de la Infección por CMV	9
I.D) Definición de Infección por CMV versus Enfermedad por CMV	10
I.E) Patología de la Enfermedad por CMV	12
I.F) Otros Métodos de Diagnóstico Tisular del CMV	13
a) Cultivo convencional y detección rápida por viales	13
b) Inmunohistoquímica	14
c) Hibridación in situ	15
d) Reacción en cadena de la polimerasa	17
I.G) Categorías Clinicopatológicas de la Infección por CMV	18
a) Infección Congénita y Pernatal	19
b) Infección en Huésped Sano	20
c) Infección en pacientes inmunosuprimidos	22
I.H) Tratamiento de la Infección por CMV	25
 II - EL TRASPLANTE HEPATICO (TxH)	
II.A) Historia y Estado Actual del TxH	27
II.B) Selección (Indicaciones y Contraindicaciones) de los Candidatos para el TxH	30

	II
II.C) Donantes de Organos	31
II.D) Utilidad de la Histopatología en el TxH	33
II.E) Principales Complicaciones del TxH	36
 III- EL CITOMEGALOVIRUS EN RECEPTORES DE TxH	
III.A) La Infección Viral Oportunista	40
III.B) Infección y Hepatitis por CMV en el TxH	41
III.C) Factores de Riesgo de la Infección Activa y de la Enfermedad por CMV	43
III.D) Profilaxis de la Infección por CMV	45
a) Inmunización Pasiva	45
b) Inmunomoduladores	46
c) Inmunización Activa	46
d) Fármacos Antivíricos	47
 - HIPOTESIS Y OBJETIVOS	49
 - PACIENTES, MATERIAL Y METODOS	52
 I - PACIENTES	
I.A) Muestra Total	53
I.B) Muestra Prospectiva Clínico Patológica	53
 II - MATERIAL	
II.A) Material Viroológico	59
II.B) Análisis de Factores de Riesgo	59
II.C) Material Anatomopatológico	59

III - METODOS

III.A) Detección Viroológica Prospectiva	62
III.B) Estudio por Microscopía Optica Convencional . .	62
a) Cambios Histológicos	63
b) Diagnósticos Anatomopatológicos	64
III.C) Estudio Inmunohistoquímico	65
III.D) Estudio por Hibridación in situ	71
III.E) Glosario de Términos Diagnósticos	74
III.F) Estudio Estadístico	75

- RESULTADOS	77
------------------------	----

I - RESULTADOS EPIDEMIOLOGICOS Y DEMOGRAFICOS

I.A) Incidencia General de Infección y de Hepatitis por CMV	78
I.B) Edad y Sexo	79
I.C) Datos Microbiológicos	80

II - FACTORES DE RIESGO DE INFECCION Y DE HEPATITIS CMV

II.A) Indicación del TxH	82
II.B) Retrasplante Hepático	83
II.C) Anticuerpos Séricos antiCMV (Serologías) preTxH en Donantes y en Receptores	83
II.D) Otras Patologías objetivadas en el Injerto . . .	84
II.E) Administración de Anticuerpos Monoclonales (inmunosupresión adicional)	86

III - RESULTADOS ANATOMOPATOLOGICOS

III.A) Cuadro Histológico de la Hepatitis por CMV . .	87
---	----

III.B) Cuadro Histológico SUGESTIVO de Hepatitis por CMV	91
III.C) Resultados con las Técnicas de Inmuno- histoquímica (IHQ) e Hibridación in situ (HIS)	93
III.D) Grado de Confirmación del Cuadro SUGESTIVO de Hepatitis por CMV. Su Patocronia	99
a) Cuadro SUGESTIVO confirmado	99
b) Cuadro SUGESTIVO no confirmado	102
III.E) Evolución de la Hepatitis por CMV	103
- DISCUSION	106
I - INCIDENCIA DE INFECCION Y HEPATITIS POR CMV . . .	107
II - FACTORES DE RIESGO DE INFECCION Y HEPATITIS POR CMV	111
III- HISTOPATOLOGIA	
III.A) Cuadro Viral Oportunista Clásico	115
III.B) Cuadro "Sugestivo de Hepatitis por CMV" . . .	117
III.C) Evaluación comparativa de las técnicas de demostración tisular del CMV	120
III.D) Revisión de los criterios de Infección y de Enfermedad por CMV	124
III.E) Evolución de la Hepatitis por CMV	127
- CONCLUSIONES	131
- FIGURAS	134
- BIBLIOGRAFIA	147

ABREVIATURAS:

ABC = Complejo avidina-biotina-peroxidasa
CMV = Citomegalovirus
C.Mín = Cámbios mínimos
DAP = Diagnóstico anatomopatológico
ECC = Enfermedad colestática crónica
ENH = Enfermedad neoplásica del hígado
EPA = Enfermedad parenquimatosa aguda
EPC = Enfermedad parenquimatosa crónica
FF = Frotis faringeo
HCA = Hepatitis crónica activa
HCP = Hepatitis crónica persistente
HIS = Hibridación in situ
HLob = Hepatitis lobulillar
HSA = Hepatitis subaguda
IF = Interferón
IHQ = Inmunohistoquímica
ISQ = Isquemia
LBA = Líquido brocoalveolar
ME = Microscopía electrónica
NCL = Necrosis centrolobulillar
OKT3 = Anticuerpos monoclonales anti-OKT3
PAP = Peroxidasa-antiperoxidasa
PB = Patología biliar
PCR = Reacción en cadena de la polimerasa
RA = Rechazo Agudo
RC = Rechazo crónico
RTxH = Retrasplante hepático
TxH = Trasplante hepático
VEB = Virus Epstein-Barr
VHS = Virus Herpes simple
VIH = Virus de la inmunodeficiencia humana adquirida
VZ = Virus de la Varicela Zoster

INTRODUCCION

Las enfermedades infecciosas siempre atormentaron a la humanidad determinando cambios en los estilos de vida e influyendo tanto en el desarrollo urbano y tecnológico como en el crecimiento de la población.

Como resultado de esa interacción y como parte de la lucha por la supervivencia humana, el combate contra las infecciones condicionó la evolución científico-tecnológica de las ciencias médicas y biológicas, cambiando la práctica médica tradicional por la tecnológica, permitiendo prevenir con las vacunas y curar con los antibióticos y agentes antimicrobianos.

Esas prácticas combinadas cambiaron el curso y la prevalencia de la mayoría de las enfermedades infecciosas, especialmente las bacterianas que tanto preocuparon a nuestros antepasados de estos dos últimos siglos. Pero también, dieron paso a nuevos desafíos, entre ellos se destacan aquellos provocados por el reconocimiento de muchas infecciones virales y sus múltiples manifestaciones, su diagnóstico, su tratamiento y su prevención.

Sin duda, nos encaminamos hacia una **nueva era**: La de la lucha contra los virus, cada vez más presentes como protagonistas centrales en muchos de los procesos salud/enfermedad/intervención médica, en nuestra sociedad.

La importancia del Citomegalovirus (CMV), objeto central del presente trabajo, se ha hecho evidente en este contexto y a continuación se exponen brevemente los datos que nos han sido de utilidad en nuestro estudio.

El CMV es un agente ubicuo que habitualmente infecta

individuos en muy diferentes áreas geográficas y clases económicas. La mayoría de las personas resultan infectadas en el curso de su vida. El gran número de individuos seropositivos informa de la enorme facilidad de su transmisión, casi por cualquier vía.

Si bien la mayoría de las infecciones por CMV son asintomáticas, ciertos grupos de pacientes son más susceptibles de desarrollar enfermedades graves, incluso con secuelas permanentes. Así, el CMV puede ser muy patógeno en la vida intrauterina, en la vida perinatal y en pacientes inmunodeprimidos de cualquier edad. Es una de las más frecuentes etiologías entre las infecciones virales adquiridas por transfusión sanguínea y es causa de morbilidad y de mortalidad en pacientes trasplantados, así como en el grupo de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana adquirida (VIH).

El CMV puede afectar a cualquier órgano, aunque se observa más frecuentemente en pulmón, hígado, cerebro, glándulas salivales, páncreas, riñón, médula ósea y tracto gastrointestinal. Su característica morfológica más importante es la producción de citomagalias con una inclusión intranuclear y/o intracitoplasmática.

Entre los pacientes trasplantados, el CMV es la etiología viral oportunista más frecuente. Su diagnóstico diferencial con otras causas de disfunción, principalmente con el rechazo celular o agudo (RA) debe ser lo más definitivo posible porque condiciona conductas terapéuticas muy distintas.

La biopsia hepática en el curso postrasplante demuestra la infección del injerto en el seno de una infección sistémica. Se puede detectar CMV por múltiples técnicas: cultivo, presencia histológica o citológica de inclusiones virales, demostración inmunohistoquímica(IHQ) de proteínas virales y demostración del DNA viral por hibridación in situ (HIS) o por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En la siguiente revisión bibliográfica se considerarán I) los principales aspectos del CMV Humano, II) un sumario informativo del Trasplante Hepático(TXH) y III) las consecuencias que el primero puede originar en los pacientes trasplantados hepáticos.

I - EL CITOMEGALOVIRUS HUMANO:

I.A) Historia del Citomegalovirus:

Las primeras descripciones del CMV surgieron a principios de siglo (1904), cuando Ribbert y Jesioneky [83] observaron las imágenes de células grandes portadoras de inclusiones en órganos de fetos y nacidos muertos. Estas células tenían de 20 a 30 nm de diametro, con núcleo grande, excéntrico conteniendo un cuerpo nuclear central circundado por halo claro [83].

Inicialmente se postuló que tales células eran de origen parasitario, tratándose posiblemente de protozoos. La detección de estructuras similares en las lesiones producidas por Herpesvirus determinó las primeras sugerencias sobre un origen viral de esas células [67]. Esta teoría gradualmente prevaleció entre los estudiosos del tema y fue apoyada por el trabajo de Cole y Kuttner, en 1926 [83], que comprobaron la transmisibilidad del virus en la glandula salival de cobaya. Pero fue Cowdry [36] en 1934 quien demostró definitivamente la relación entre los cuerpos de inclusión y ciertas infecciones virales por medio de estudios experimentales.

En los años siguientes se llegó a un gran avance con la descripción del cuadro patológico de la Enfermedad de Inclusión Citomegálica [239], y con la detección de virus en pacientes vivos a través del estudio citológico de orina [57].

Hasta entonces las más directas características morfológicas del virus habían sido evidenciadas por Minder en 1953, que estudió por microscopía electrónica (magnitud de X

25,000) células con inclusiones citomegálicas en tejido pancreático: partículas 100 nm en citoplasma y en el halo claro, alrededor de inclusiones intranucleares [127].

El aislamiento del CMV humano solo pudo ocurrir después del desarrollo de la técnica de crecimiento en medio de cultivo celular. Tal hecho ocurrió independientemente en tres centros de investigación diferentes en 1956: por M.Smith en St.Louis [188], por Weller y col en Boston [230] y por Rowe y col en Bethesda [171].

El cultivo celular del virus ha sido una poderosa herramienta para la investigación de los aspectos clínicos y patológicos de la infección por CMV. Entre ellos hay que resaltar el reconocimiento de la infección fuera del contexto pediátrico, impulsando los recientes estudios entre los pacientes inmunosuprimidos y llegando a ser el **"primer virus oportunista"** [231].

Ahora el CMV es reconocido como uno de los seis Herpesvirus humanos, que se caracterizan por compartir las interesantes propiedades de ser incurables, permanecer latentes en tejido y ser reactivados durante la inmunosupresión [224].

Los últimos conocimientos de aspectos moleculares del CMV y los avances en la prevención y tratamiento de su infección en la población susceptible, prometen inaugurar una nueva etapa de su historia.

I.B) Biología y Patogenia del Citomegalovirus:

El CMV pertenece a la familia de los Herpesvirus (Herpesviridae) que también incluye los virus Herpes simple (VHS I,II,VI), el virus de la Varicela Zoster(VZ) y el virus de Epstein-Barr(VEB) [82]. Es el miembro más grande de los Herpesvirus humanos, con considerable heterogeneidad genómica y antigénica entre sus diferentes cepas (AD 169, C-87, Davis, Esp. y Kerr) [85,86,212]. Todavía se desconoce si las diferencias antigénicas entre las cepas del CMV tienen consecuencias clínicas en términos de virulencia o en términos de riesgo de reinfección por múltiples cepas virales [212].

Estructuralmente el CMV tiene un core constituido por una doble cadena de DNA de aproximadamente 230 kilobases (kbp) formada por un componente largo y uno corto que se fijan por una secuencia repetitiva terminal que puede invertirse durante la replicación. Tal genoma está envuelto en una matriz protéica y recubierto por doble capa lipídica conteniendo envoltura externa y una capsida formada por 162 capsómeros, constituídos por polipeptidos. El virión total tiene 180 milimicras de diámetro [84,121]. Una forma transicional y no infectiva del virus la constituyen los cuerpos densos, encapsulados, deficientes de ácidos nucleicos, y que contienen glicoproteínas además de la matriz proteica [121].

Los estadios de replicación del CMV son similares a los de otros Herpesvirus. El tiempo de absorción y penetración es el mismo, pero las etapas replicativas subsecuentes son muy prolongadas (4 días vs 8 horas del Herpesvirus). Para que sean

posibles la replicación y la expresión intracelular del CMV, es necesaria la síntesis "en cascada" del RNAm y de tres tipos de proteínas virales [72,73,208]. Dichas proteínas son:

a) proteínas alfa o precoces, necesarias para el control de la síntesis de macromoléculas en la célula huésped.

b) proteínas beta o tempranas, utilizadas en el control de la síntesis de los nuevos viriones.

c) proteínas gamma o tardías, necesarias para la formación de los componentes estructurales del virión.

La denominación de "expresión en cascada" se debe a que es necesaria la presencia de los productos precoces para producción de los productos tardíos [72,73,121].

Trás la infección viral, las modificaciones morfológicas biológicas y antigénicas observadas en el huésped son muy variadas. El CMV puede causar lesión celular (acción citopática) trás la infección y la replicación que conducen finalmente a la destrucción (lisis) de las células diana. Potencialmente, todas las células nucleadas puede ser células diana para replicación del CMV y sufrir posterior lisis [78].

Los mecanismos de defensa inmunológica del huésped contra el CMV pueden ser celulares y humorales. La expresión de antígenos CMV-específicos (proteínas virales) en la superficie de la célula puede ser suficiente para vulnerabilizar a la misma ante un ataque citotóxico por linfocitos T. En tal caso la lesión, aunque desencadenada por el virus, sería causada por la respuesta inmunocelular del huésped [78]. Entre los mecanismos de la respuesta inmunocelular, el más importante es

la citotoxicidad de las células T, tanto frente a los antígenos de la clase I como ante los antígenos de la clase II del HLA [77,121].

La participación del mecanismo de defensa humoral es evidente tanto en la primoinfección como en la reactivación. Los anticuerpos IgM, detectados por ELISA, ocurren en la infección aguda inicial pero también su título se eleva en los episodios recurrentes con o sin enfermedad sintomática [121].

I.C) Historia Natural de la Infección por Citomegalovirus:

El hombre es el único reservorio de CMV Humano y para su contagio se requiere un íntimo contacto con los individuos que excretan el virus por orina, saliva, semen, lágrimas u otras secreciones. Las rutas naturales de infección son el útero o la leche materna, durante el periodo perinatal, el contacto familiar, durante los primeros meses de vida, o el inicio de la actividad sexual [60].

Desde el punto de vista inmunológico, el CMV puede producir tres tipos de infecciones [76,78,166]: **a) Primaria**, que ocurre en las personas que carecen de anticuerpos contra el CMV (seronegativas); **b) Reactivación**, definida como el aumento por cuatro veces del título de anticuerpos anti-CMV en un paciente que anteriormente mostraba un título positivo, aunque bajo; **c) Reinfeción** (o superinfección), se produce en aquel paciente seropositivo que es reinfecctado por una cepa (exógena) distinta de la que previamente le infectó, lo cual origina una nueva excreción vírica y un incremento del título

de sus anticuerpos.

Igual que los otros miembros de la familia herpesvirus, tras una infección primaria (primoinfección), a menudo asintomática, el CMV permanece **latente** en las células de la sangre periférica (linfocitos, monócitos, polimorfonucleares y células natural-killer): la persistencia del genoma no implica la producción de proteínas víricas o viriones infectantes. La persistencia del virus en este estado no replicativo o con un nivel de replicación no detectable ocurre probablemente durante toda la vida [4,29,60,109,198].

El paso de **infección latente** a **infección activa** (reactivación) puede ocurrir una o muchas veces, en relación con deficiencias transitorias o permanentes en la inmunidad celular. También es posible que la reinfección exógena sea un hecho frecuente en personas que ya tienen su propia infección endógena latente [27,109]. En la mayor parte de las ocasiones, tanto la primoinfección como la reactivación o la reinfección suelen ser asintomáticas pero también pueden dar lugar a una enfermedad localizada o sistémica (diseminada) dependiendo del estado inmunológico del paciente [4]. (Vide infra)

I.D) - Definición de Infección CMV versus Enfermedad CMV:

La distinción entre la infección por CMV y la enfermedad por CMV es necesaria para la comprensión de la acción del CMV en el paciente.

La **infección por CMV** se define por el aislamiento o por la identificación del virus en algun producto biológico

(sangre, orina, esputo o heces) o por la seroconversión (presencia de CMV-IgM en un individuo que era negativo) o por el aumento en cuatro veces de los títulos de CMV-IgG en el individuo que era previamente seropositivo (reactivación) en ausencia de síntomas clínicos [98,209,212].

En contraste, la **enfermedad por CMV** es definida como la "invasión" o la infección sintomática con evidencia histológica de efectos citopáticos virales o de cultivo positivo para CMV desde espécimes de tejido profundo que explica las manifestaciones clínicas como: fiebre, artromialgias, disnea, síntomas gastrointestinales, alteraciones visuales o evidencias semiológicas objetivas (leucopenia, infiltración pulmonar, hepatitis, retinitis, enteritis) [9,20,212,224]. Los especímenes utilizados para el diagnóstico de enfermedad por CMV pueden ser biopsias pulmonares y hepáticas, punciones endoscópicas de mucosas, punciones broncoscópicas, lavado broncoalveolar y líquido cefalorraquídeo [20].

La presencia de cultivo positivo en sangre o de seroconversión en el seno de una infección sintomática es también considerada por algunos autores como suficiente para establecer el diagnóstico de enfermedad por CMV [109,212].

La enfermedad diseminada por CMV se define por la evidencia clínica o de laboratorio de enfermedad en dos o más órganos no contiguos o de enfermedad localizada en un solo órgano coincidiendo con el aislamiento del virus en la sangre [212].

I.E) Patología de la Enfermedad por Citomegalovirus:

A diferencia de otras infecciones, la enfermedad por CMV es un diagnóstico morfológico y por tanto habitualmente, depende del patólogo [117].

En el seno de una infección sistémica, el CMV puede afectar casi cualquier órgano aunque se observa sobre todo en pulmón, hígado, cerebro, glándulas salivales, pancreas, riñón, médula ósea y tracto gastrointestinal [224]. Su característica morfológica más importante es la presencia de inclusión intranuclear y/o intracitoplasmática en citomegalias [30,31, 86,224].

Las típicas células gigantes (citomegalias) son dos a cuatro veces mayores que las células normales circundantes (25-40 milimicras). El gran núcleo redondeado (10-15 milimicras) es frecuentemente excéntrico. La inclusión, en si, mide de 8 a 10 milimicras y también puede estar desplazada presentando un aspecto de "ojo de lechuza". Es eosinófila o anfófila, separada de la membrana nuclear por un halo claro. La membrana nuclear se caracteriza por una espesa cromatina, a veces formando agregados en uno de los polos nucleares [86].

Ocasionalmente se pueden observar unas características inclusiones granulares en el citoplasma. Estas miden de 0,3 a 0,5 milimicras, aparecen como gránulos basófilos poco definidos y pueden estar entremezclados con vacuolas. Estas inclusiones son muy importantes en la diferenciación del CMV con otros virus DNA, particularmente con los virus herpes simple y varicela zoster [86].

El infiltrado celular es frecuente pero no siempre se observa en la proximidad de las citomegalias. El infiltrado consta de células plasmáticas, linfocitos, macrófagos, neutrófilos y, en los casos de neonatos, también de elementos hematopoyéticos [86].

En la historia de la infección tisular por CMV, la práctica de la patología estuvo utilizando hasta hace poco la presencia de las citomegalias con inclusión intranuclear tipo A [36], para establecer el diagnóstico. Actualmente se admite que existen células infectadas abortivas o latentes en tejido sin producir la típica citomegalia y que no pueden reconocerse en secciones tisulares convencionales [86,147]. Es por ello que se ha hecho necesario utilizar nuevos métodos de diagnóstico tisular para alcanzar más sensibilidad y especificidad.

I.F) Otros Métodos de Diagnóstico Tisular del Citomegalovirus:

La disponibilidad de antivíricos eficaces para el tratamiento de las infecciones por CMV ha potenciado la búsqueda de métodos rápidos de detección vírica que permitan las máximas celeridad y sensibilidad en la realización del diagnóstico de laboratorio de esta infección.

Entre las técnicas de **diagnóstico tisular** de infección por CMV las más utilizadas son las siguientes:

a) Cultivo convencional y detección rápida en viales:

La detección mediante anticuerpos monoclonales dirigidos

contra los antígenos tempranos y precoces del CMV en cultivos celulares convencionales se describió en 1983 [72], observándose una sensibilidad al del 70% y una especificidad cercana al 100% a las 24 horas [73]. Posteriormente, investigadores de la Clínica Mayo introdujeron una modificación en esta técnica consistente en incorporar la centrifugación de baja velocidad durante 40 minutos a las células infectadas con el espécimen a explorar (método de cultivo en shell vial) [65]. Con dicha técnica se ha comprobado un aumento de la sensibilidad del diagnóstico, así como una mayor rapidez ya que pueden observarse focos positivos de fluorescencia a las 16 horas del contacto [144,149].

b) Inmunohistoquímica:

La detección de los antígenos precoces, tempranos y tardíos del CMV mediante anticuerpos monoclonales o policlonales y usando la técnica de inmunoperoxidasa en tejido ha demostrado ser un método diagnóstico rápido y sensible en pacientes inmunosuprimidos [98,147,148,150,168,175,226]. Además, la localización de estos antígenos a nivel celular y subcelular revela informaciones sobre el estado de la transcripción y de la replicación viral [217].

La técnica de inmunohistoquímica, con el objetivo de detectar cualquier tipo de antígenos, viene desarrollándose desde los años setenta [93]. Está basada en la posibilidad de unir químicamente un anticuerpo a algún enzima. Los anticuerpos necesarios para la aplicación de esta técnica se obtienen por

medio de los hibridomas. El enzima más utilizado es la peroxidasa [93].

Existe una técnica directa: aplicación directa del anticuerpo contra el antígeno que se sospecha presente en el tejido explorado, marcado con peroxidasa, seguido de la aplicación de la diaminobencidina como revelador de la peroxidasa. Actualmente, la técnica más habitual consiste en un método indirecto: un complejo peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) con un anticuerpo puente. Este último provoca un efecto multiplicador, de tal manera que se puede lograr buenas imágenes a concentraciones bajas. Esta técnica presenta por tanto una gran sensibilidad para objetivar mínimas cantidades de los antígenos explorados. La aplicación de la diaminobencidina produce un color marrón al ser oxidada en las áreas donde se ha fijado previamente el complejo PAP, y por tanto donde existe el antígeno problema.

Con similar fundamento a la técnica de PAP se han inventado últimamente otras técnicas que utilizan otros complejos enzimáticos. Entre ellas los más utilizados son aquellos con avidina-biotina que también son útiles para la detección del CMV [93].

c) Hibridación in situ:

La comercialización de reactivos para la detección del genoma del CMV en tejido por hibridación (ENZO, PathoGene), permitió una expansión progresiva de este método entre los laboratorios clínicos y anatomopatológicos.

El método de hibridación del DNA utiliza las propiedades físicas y químicas fundamentales de la moléculas de DNA para detectar e identificar secuencias específicas de este DNA y por tanto también de organismos específicos. El DNA de la mayoría de los organismos y de los virus, incluido el CMV, es de doble cadena, es decir esta compuesto de dos cadenas complementarias. Cuando estos pares de cadenas se calientan se separan (desnaturalización), para formar dos cadenas aisladas. En condiciones apropiadas las cadenas complementarias separadas pueden reunirse para volver a formar una molécula de DNA completa. Este último proceso es denominado hibridación. La hibridación de cadenas complementarias de DNA es un proceso extremadamente fiable. Si las cadenas de DNA no son complementarias no se uniran entre si. Además, la presencia de cualquier DNA no relacionado no afectará el proceso de hibridación si no muestran complementaridad.

La hibridación con una sonda de DNA puede detectar e identificar secuencias específicas de ese DNA. Una sonda de DNA es un segmento de ese DNA que es específico y complementario de el DNA del organismo o del virus que tiene que ser detectado o identificado. Los procedimientos para la hibridación de una sonda de DNA con el DNA diana comprenden tres pasos:

- 1) desnaturalización de la sonda de DNA y del DNA de la muestra,
- 2) hibridación de la sonda con el DNA del espécimen y
- 3) medida de la cantidad de hibridación entre el DNA de la sonda y el DNA del espécimen, o bien demostración de su

presencia si se trata de un tejido en corte histológico (=HIBRIDACION IN SITU) [17,71].

La cantidad de DNA o la demostración de la positividad de DNA hibridado está directamente relacionada con la complementaridad de ambas cadenas (sonda y agente viral). Si no hay DNA complementario (viral) en el tejido explorado, la sonda de DNA no se hibridará. Para la hibridación in situ es necesario usar sonda de DNA marcada (ej: biotinada), que al introducirse en la célula e hibridarse con el agente permita revelar (hacer visible) si está presente ese determinado fragmento del DNA buscado en el tejido explorado. Los tipos de marcadores más utilizados son los isótopos radioactivos, la digoxigenina, los grupos fluorescentes y la biotina. Esta última, actualmente más utilizada, es una vitamina fácilmente detectable por su capacidad de unirse con la avidina. Coincidentemente es también la base de los sistemas de marcaje empleado en inmunohistoquímica (vease infra). La ventaja del empleo de la biotina sobre el uso de los isótopos es que se evita el peligro de radiación y además el marcaje es permanente.

La hibridación cuando aplicada sobre el DNA presente en corte histológico (in situ), permite el estudio simultáneo de la morfología de la célula y la localización del DNA hibridado.

d) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

La PCR es una técnica muy sensible que es de gran valor demostrativo en la identificación de muchas infecciones virales

[40,141]. Esta técnica cumple un papel diagnóstico para el CMV en sangre o/y orina ya bien valorado en varias situaciones de inmunosupresión, incluso en pacientes trasplantados hepáticos [24,26,40,43,153]. Todavía, su aplicación en tejido hepático no ha sido definitivamente evaluada y documentada en la literatura [15,169].

La reacción en cadena de la polimerasa es también una técnica de hibridación. Previamente a los pasos anteriormente descritos utiliza una amplificación de diferentes regiones genómicas por medio de la polimerasa que dispara (multiplica) una reacción en cadena aumentando la disponibilidad de elementos. Para el CMV se utiliza una DNA polimerasa termoestable en una reacción automatizada in vitro mediante un aparato de ciclos térmicos (DNA thermel-cycles, Perkin Elmer) [40,52,153,214].

I.G) Categorías Clinicopatológicas y Demográficas de la Infección por Citomegalovirus:

La presentación demográfica de la infección por CMV es variada. De una forma general podemos separar la patología infecciosa ocasionada por CMV en 3 categorías basadas en los diferentes grupos de población a los que afecta: 1° Infección congénita y perinatal, 2° Infección en huéspedes sanos y 3° Infección en pacientes inmunodeprimidos.

a) Infección Congénita y Perinatal:

La infección por CMV es frecuente en los recién nacidos y en los lactantes hasta el primer año, alcanzando una ocurrencia entre los 0,4% y los 2,2% [200].

Cuando la infección es detectada durante el embarazo (en el útero) o en el parto es llamada **infección congénita o neonatal**, y se define **infección perinatal** cuando el virus no es aislado durante el nacimiento y sí dentro de los primeros meses de vida [87].

El más fiable método diagnóstico de las infecciones congénita y perinatal es el aislamiento del virus por cultivo, habitualmente en muestra de orina o en frotis faringeo. La viruria demostrada en el nacimiento es suficiente para determinar una infección congénita. Cuando la primera detección del virus ocurre entre la tercera y quinta semana tras el nacimiento indica una infección perinatal si el virus no ha sido aislado al nacimiento [87]. El diagnóstico serológico es dudoso en recién nacidos y lactantes por la imposibilidad de distinguir específicamente los anticuerpos transferidos por la madre [87]. El test de IFA (Inmunofluorescencia) para demostración de anticuerpos tempranos ha sido propuesto con el objetivo de determinar el diagnóstico por serología de las infecciones congénitas y perinatales, pero su eficacia no ha sido totalmente comprobada [199].

La mayoría de las infecciones son **asintomáticas** y en torno de 7,5% de los niños **presentan sintomatología** [143]. Entre éstos existen las formas localizadas y las formas diseminadas.

La **forma localizada** con afectación de un único órgano suele ser un hallazgo de autopsia. La **enfermedad diseminada** es severa y de evolución fulminante. Si la infección es precoz puede provocar abortos o bien ocasiona partos prematuros o niños nacidos muertos. Cursa con púrpura trombocitopénica, anemia hemolítica, pneumonitis, ictericia, hepatoesplenomegalia y calcificaciones cerebrales. La muerte suele producirse por insuficiencia hepática aguda, insuficiencia respiratoria, fracaso renal y fenómenos hemorrágicos. En algunos casos de supervivencia el niño puede quedar con secuelas de una lesión cerebral: corioretinitis, microcefalia y oligofrenia [3,87,143, 202,232].

Que la infección sea **sintomática** o no puede depender de la serología de la madre. Las madres seroposivas o seronegativas pueden igualmente tener hijos con infección congénita, sin embargo los recién nacidos de madres seronegativas, que posteriormente adquirieron una infección primaria, son más frecuentemente sintomáticos [201,202].

El 5-20% de las infecciones **asintomáticas** pueden desarrollar manifestaciones tardías durante la primera y segunda infancia. Pueden consistir en disfunción neuromuscular, lesión auditiva progresiva y deficiencias escolares condicionadas por un deterioro variable del coeficiente intelectual [219].

b) Infección en Huésped Sano:

El CMV puede infectar espontáneamente al huésped sano en

forma de mononucleosis con o sin afectación de múltiples órganos, tales como: corazón, pulmón, sangre, hígado, piel, tracto gastrointestinal y sistema nervioso central [12,61,92, 232].

Cohen [29] (1985) revisó 62 pacientes de la literatura con la forma espontanea de la infección por CMV, para caracterizar mejor ese síndrome, y añadió 10 casos propios. En esta revisión consideró como huésped sano todo aquel que no tenía antecedentes de transfusiones recientes, de terapéuticas con drogas inmunosupresoras, que carecía de patologías predisponentes como neoplasias, insuficiencia renal crónica, infecciones concomitantes, malnutrición (entre las enfermedades que producen inmunodepresión) y que no estaba incluido en un grupo de alto riesgo para el VIH.

El síndrome mononucleósico fue la forma de presentación más frecuente de la infección. Típicamente se inició con un cuadro febril y de malestar general con disfagia, cefalea y manchas cutáneas. La existencia de adenopatías y de hepatoesplenomegalia es frecuente. Los datos de laboratorio aportan una linfocitosis con presencia de linfocitos atípicos (88% de los casos) y un aumento moderado de las transaminasas (90% de los casos) [29].

La infección por CMV puede simular la infección mononucleósica provocada por el virus de Epstein-Baar (VEB), aunque son varios los aspectos que pueden diferenciarlas como: edad (los pacientes se afectan más tardíamente por el CMV que por el EBV), fiebre (ocurre durante un periodo más largo en la

infección por CMV), faringitis y adenopatías (son menos frecuentes en el CMV). La evolución y el pronóstico son habitualmente favorables y no requieren ninguna terapéutica específica [29].

Los métodos diagnósticos más fiables y específicos son el cultivo en sangre, la biopsia y la elevación sérica por 4 veces de los títulos de anticuerpos antiCMV [29].

La biopsia hepática puede demostrar alteraciones inespecíficas sin necrosis, hepatitis aguda con necrosis y hepatitis granulomatosa. Esta última habitualmente está acompañada de linfocitosis con linfocitos atípicos, además del aumento sérico de las transaminasas, fosfatasa alcalina y bilirrubina. Aunque se hayan observado células gigantes (granulomas) en tejido hepático no ha sido reportada la evidencia de cuerpos de inclusión. Es de notar que también se han observado granulomas en la mononucleosis por VEB [29].

c) Infección en pacientes inmunosuprimidos:

La enfermedad por CMV constituye una causa importante de morbilidad y mortalidad en el paciente inmunosuprimido. Todas las circunstancias que ocasionan un inmunodéficit celular T condicionan una mayor susceptibilidad para padecer la gran variedad de síndromes clínicos causadas por el CMV. Es evidente que la enfermedad por CMV puede poner en peligro la vida del paciente inmunodeprimido ocasionando una enfermedad grave, incluso en ausencia de otros agentes patógenos. La expresión clínica puede depender de la severidad de la patología base

causante del estado más o menos inmunodeficiente del huésped. A menudo la infección por CMV será una complicación en el seno de una situación terminal.

Las situaciones de inmunosupresión adquirida más comunes son tres [219]: pacientes con neoplasias en tratamiento con inmunosupresores, enfermos con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y receptores de órganos trasplantados.

Diversos estudios anatomopatológicos en pacientes **neoplásicos** [37,51,88] han demostrado que la infección diseminada por CMV es más frecuente en pacientes con neoplasias hematológicas y en aquellos que reciben tratamiento quimioterápico. En estas dos situaciones parece que el factor determinante es la depresión central del sistema reticulo-endotelial [219].

Más del 90% de los pacientes con **síndrome de inmunodeficiencia adquirida** (SIDA) sufren una infección por CMV [45,46] y existe evidencia morfológica de infección diseminada en más de 60% de los casos autopsiados [112]. La retinitis es la manifestación clínica más común y cursa con pérdida de visión o escotomas y con hallazgos característicos en fondo de ojo, coincidentes con el aislamiento de CMV en orina y/o en sangre [4,19,45,46]. Esta retinitis por CMV suele diagnosticarse en estadios tempranos de la enfermedad, a diferencia de las otras manifestaciones de la infección por CMV [4]. La afección del tracto gastrointestinal es también frecuente manifestandose en forma de colitis, de gastritis o

de esofagitis y cursando con dolor abdominal y/o diarreas y/o disfagia. En ocasiones, pueden sumarse complicaciones, como hemorragia digestiva o perforación cólica, que pueden producir la muerte del paciente. Otras manifestaciones de la infección por CMV en enfermos con SIDA son la adrenalitis, la encefalitis y la hepatitis, aunque son de menor relevancia clínica [183].

La infección por CMV se presenta en un número importante de pacientes sometidos a **trasplante de órganos** (riñón, hígado, corazón, pulmón y médula ósea), bien en forma de infección primaria, de reactivación de infección latente o de reinfección por una nueva cepa en un paciente anteriormente infectado por otra [47,76,89,123,126,142,172,173,222]. El órgano donante es la fuente más importante de transmisión del CMV [4,27,70,187] tanto en individuos seropositivos como en los seronegativos. Ello ha sugerido que la infección primaria podría ser evitada si se utilizaran órganos de donantes seronegativos, pero ello supone una gran dificultad por la elevada seroprevalencia de la infección en la población general [4,60,97,109].

Clínicamente la infección por CMV en trasplantados puede cursar como: 1) un síndrome mononucleósico febril similar al observado en individuos inmunocompetentes con leucopenia, linfocitos atípicos y trombopenia, o bien 2) un cuadro localizado (neumonitis, hepatitis, colitis, etc), o por último 3) un cuadro grave de afección multiorgánica (enfermedad diseminada) que puede causar la muerte del paciente, generalmente dentro de las 8 semanas posteriores al trasplante [4].

De modo general la morbilidad en los trasplantados depende también de otros dos factores, el grado de inmunosupresión y el tipo de órgano trasplantado [4]. Los pacientes con pautas de inmunosupresión que incluyen globulina antitimocítica o anticuerpos monoclonales anti-OKT3 tienen un riesgo superior de infección por CMV y de mortalidad relacionada con la misma [109,148,187,228]. Asimismo, los receptores de trasplante de medula ósea e hígado tienen una mayor incidencia que los receptores de injertos renales [4].

Combinando esos factores podrían resumirse como aspectos más importantes que: a) la neumonitis intersticial por CMV es especialmente frecuente en trasplantados de medula ósea, corazón y corazón-pulmón, observándose una clínica más grave en los pacientes con infección primaria [68,69,123,189,233]; b) los receptores de trasplante hepático padecen a menudo enfermedad sintomática por CMV, con especial afección del órgano trasplantado en forma de hepatitis o bien en forma diseminada [104,109,187]; 3) un importante efecto indirecto de la infección por CMV es un incremento notable de las infecciones graves por hongos, bacterias y parásitos [48,68,148].

I.H) Tratamiento de la Infección por Citomegalovirus:

Después de varios años de ensayos con diversos antivíricos (foscarnet y aciclovir) un derivado de la guanina, el glanciclovir (9-[1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl]), presentó una acción virostática potente "in vitro" frente al CMV y, hasta

determinado punto también "in vivo", lo que justificó su empleo en los pacientes graves. Se está utilizando con éxito moderado en las infecciones gastrointestinales y oculares por CMV. Su efecto beneficioso es más dudoso en las neumonías intersticiales [10]. En los últimos años se ha generalizado el uso de ganciclovir para el tratamiento de las infecciones graves por CMV en grupo de pacientes trasplantados y los resultados han sido aparentemente buenos [10,49,80,109,110,120,145,179,184,207].

Los mayores inconvenientes del ganciclovir son: a) que al ser viroestático, al cabo de unas semanas de interrumpir el tratamiento, el CMV puede reactivarse, y b) que puede producir neutropenia importante [20]. A pesar de estos dos problemas, mientras no aparezca otro fármaco mejor, su uso está justificado al menos en pacientes con grave riesgo. En los pacientes con inmunosupresión se suelen reducir las dosis terapéuticas en los casos de infección sintomática por CMV hasta conseguir que desaparezca el cuadro infeccioso. Por otra parte, en los pacientes trasplantados, la reducción de los fármacos inmunosupresores pueden llevar a la indeseada consecuencia de activar el posible rechazo. Así, la disponibilidad del ganciclovir permitió mantener una dosificación inmunosupresora convencional que significó, en la práctica, una ventaja suplementaria del tratamiento de estos pacientes [109].

II - EL TRASPLANTE HEPATICO (TxH):

II.A) Historia y Estado Actual del TxH:

El primer Trasplante Hepático en el ser humano fue realizado en Estados Unidos por el Dr. T.E.Starzl en 1963 [203] abriendo un nuevo camino en el tratamiento de las enfermedades hepáticas irreversibles [55,128,129,170,204,205,225,237]. Sin embargo, los malos resultados obtenidos inicialmente hicieron que esta técnica se aplicara en muy pocos casos y que a lo largo de los primeros 20 años el TxH fuera considerado un procedimiento en fase de investigación más que como una auténtica alternativa terapéutica [167]. Estos malos resultados iniciales se debían fundamentalmente a dos causas: 1º) la **selección de los pacientes**: durante esos años la técnica estaba basicamente reservada para enfermos terminales afectos generalmente de hepatocarcinoma y de cirrosis complicada, y 2º) el **tipo de tratamiento inmunosupresor utilizado**: La inmunosupresión para que sea efectiva debe conseguir un nivel de tolerancia inmunológica lo suficientemente eficaz como para prevenir y controlar el rechazo del injerto y lo suficientemente selectiva como para evitar la instauración de complicaciones tales como infecciones agudas y letales. Durante esos primeros años el régimen inmunosupresor consistía únicamente en azatioprina y prednisona. Con estos tratamientos los pacientes fallecían a consecuencia de fallo en la cicatrización de las heridas y de las severas infecciones agudas resultantes de la disfunción granulocítica provocada en

el sistema inmune por estos fármacos [236].

Con la aparición de la **ciclosporina A** en el campo de la inmunosupresión, las expectativas de evolución de los pacientes trasplantados han cambiado mucho [21]. La ciclosporina, potente agente inmunosupresor, no condiciona las complicaciones anteriormente observadas. A partir de la confirmación de los efectos beneficiosos de esta nueva droga, se estableció la triple terapia (azatioprina, prednisona y ciclosporina). Esto permitió un mejor control en la prevención y en el manejo del rechazo y un consecuente incremento del porcentaje de supervivencia al año de seguimiento del paciente trasplantado hepático (pasando del anterior 30% a más del 70%) [236].

El uso de la ciclosporina, unida a los avances notables en la técnica quirúrgica (empleo del bypass venoso-venoso), y un notable cambio de mentalidad en relación a las indicaciones del trasplante han condicionado que se consolidó como una alternativa terapéutica real para muchas enfermedades hepáticas terminales [109,167]. Así, a partir de la última década, el TxH se practicó en un número cada vez mayor de pacientes y por un número creciente de centros en Estados Unidos y en Europa con unos resultados cada vez mejores [114].

En España, a partir de 1984, año en que se realizó el primer TxH en el Hospital de Bellvitge de Barcelona [116], han ido proliferando los programas de trasplante de hígado de forma que en la actualidad existen 13 centros que los realizan con una actividad gradualmente creciente [130]. Así, mientras que en 1989 se efectuaron 169 TxH en, en 1991 se ha llegado a la

cifra de 407 (datos de la Organización Nacional de Trasplantes) [109].

En la actualidad, la serie de TxH del Hospital "12 de Octubre" de Madrid es la más amplia de las existentes en España. Desde el inicio del programa en 1986 hasta el momento actual, el Servicio de Cirugía Digestiva II (Prof.Dr. E.Moreno González) ha efectuado un total de 345 TxH a 282 pacientes. Los resultados en cuanto a escasa morbi-mortalidad han sido hasta el momento excelentes, con una supervivencia actuarial al año post-TxH del 74,6% y a los 3 años del 62,2% [130].

El tipo de TxH utilizado en la práctica totalidad de los realizados en los últimos tiempos ha sido el trasplante ortotópico. Tal acto quirúrgico consiste en la exéresis del hígado enfermo seguida de la colocación, en el mismo lugar anatómico, de un hígado sano procedente de un donante de órganos [128]. Aunque el TxH puede ser considerado preferentemente como una técnica quirúrgica, es importante señalar que en este procedimiento terapéutico existen otros aspectos no estrictamente quirúrgicos (como la selección de los pacientes candidatos a ser trasplantados, la obtención de donantes adecuados de órganos, los cuidados clínicos del periodo postoperatorio y el control del estado del injerto por biopsias hepáticas) que son tan importantes como la propia intervención quirúrgica en relación a los resultados finales [167].

II.B) Selección (Indicaciones y Contraindicaciones) de los Candidatos para el TxH:

La selección de candidatos para TxH es difícil y relativamente imprecisa. Ello es debido a que los criterios de selección de los pacientes han variado, generalmente aumentando en amplitud y modulándose en uniformidad a medida que se han ido incrementando los conocimientos y la experiencia en este procedimiento terapéutico [113]. Dicha selección debe tener dos objetivos principales: a) incluir aquellos pacientes que se beneficien realmente del trasplante, y b) excluir aquellos otros en los que la expectativa de éxito sea muy escasa [167].

En términos generales, cualquier enfermedad hepatobiliar progresiva, mortal e intratable por medios convencionales constituye una indicación de trasplante hepático. Así, actualmente, casi ante cualquier paciente con evidencia de hepatopatía terminal se considera la posibilidad de realizarle un TxH como medida terapéutica [90,91,167].

En la actualidad, las indicaciones de TxH se dividen en 4 grandes grupos [113]:

- a) Hepatopatías crónicas severas e irreversibles, que incluyen las de origen colestático, hepatocelular (especialmente la cirrosis posthepatítica y la etílica) y vascular (ej.: Síndrome de Budd-Chiari),
- b) Fallo hepático fulminante,
- c) Neoplasias hepáticas malignas irresecables pero confinadas al hígado, y
- d) Enfermedades metabólicas.

Una vez se ha establecido que un paciente presenta una de las hepatopatías susceptibles de ser tratadas mediante TxH, hay que precisar el momento idóneo para realización de esta técnica. En este sentido existe un aforismo, compartido por todos los grupos de TxH, que dice que el trasplante debe efectuarse **"ni demasiado pronto, ni demasiado tarde"**: cuando la enfermedad del paciente está lo suficientemente avanzada para que su riesgo espontáneo sea claramente superior al del propio trasplante, pero sin llegar a estar tan avanzada que impida la práctica de la intervención quirúrgica agresiva que es el TxH [134].

Tras objetivar que existe una enfermedad hepática que está entre las indicaciones es imprescindible realizar una cuidadosa evaluación para determinar si existen otros factores (infecciones, fallos de otros sistemas, etc) que constituyan contraindicación para el trasplante. En función de los mejores resultados obtenidos en la práctica actual, la lista de contraindicaciones también se ha ido modificando. En este momento únicamente pueden considerarse contraindicaciones absolutas la edad avanzada, la presencia de sepsis, las metástasis hepatobiliares, la enfermedad cardiorrespiratoria severa y la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) [55,62].

II.C) Donantes de Organos:

Hoy en día la escasez de donantes es el principal obstáculo para el trasplante de hígado [escandinava y otros].

En la mayoría de los centros, la selección y la clasificación de los candidatos a TxH la realiza un comité médico interdisciplinario. Los pacientes aceptados para TxH se incluyen en una **"lista de espera"** de los donantes de órganos. En ella existen unos criterios de prioridad bien definidos (fallos agudos, infancia, compatibilidad ABO, etc) [113]. La urgencia del trasplante está fundamentalmente determinada por el grado de descompensación hepática y por las expectativas de supervivencia a corto plazo [113].

Para establecer entre los donantes de órganos si el hígado es trasplantable se han de reunir una serie de características: a) edad inferior a 50 años, b) muerte cerebral bien documentada, c) ausencia de enfermedades transmisibles, y d) normalidad hepática anatómica y funcional del hígado [167]. En relación con la edad, la cifra en años puede ser más alta en determinados casos, ya que existe controversia en cuanto a que ésta afecte la función del injerto trasplantado, considerada aisladamente y dentro de unas margens [66].

Los tipos de compatibilidad requerida entre el donante y el receptor son escasos. Sin embargo, es conveniente una cierta homogeneidad de peso y de talla entre donante y receptor. Particularmente en los niños pequeños, este problema se ha resuelto mediante la implantación de un lóbulo o de un segmento hepático. Otro requisito generalmente exigible es la compatibilidad de grupo sanguíneo ABO, aunque este criterio puede no ser tenido en cuenta en caso de un fallo fulminante. Al contrario de lo que ocurre con el trasplantes de otros

órganos, en el TxH no se considera relevante la compatibilidad del sistema HLA entre donante y receptor, ya que no existen pruebas concluyentes de que el grado de compatibilidad HLA tenga una influencia decisiva en la supervivencia post-TxH [167].

II.D) - Utilidad de la Histopatología en el TxH:

El patólogo, al asumir su participación en un programa de trasplante hepático, se ve implicado en las siguientes actividades hospitalarias [33]:

1º) Protocolización: Es precisa la sistematización prospectiva de los datos morfológicos orientada a la obtención de experiencia y al diseño de futuros trabajos de revisión e investigación. Un modelo de protocolización recomendable incluye estudios histopatológicos sistematizados del a) hígado nativo y b) injerto hepático, tras su revascularización (biopsia de tiempo "0"), a la 1º-2º semana potrasplante, en los episodios de disfunción del injerto, y anualmente.

2º) Selección de pacientes: Es exigible que exista diagnóstico biopsico de la hepatopatía crónica terminal del paciente propuesto previamente al TxH. En algunos hospitales se practica la biopsia de selección del paciente incluso en las hepatitis fulminante, obteniéndola por vía transyugular. Respecto a la biopsia preoperatoria del órgano donante (realizada antes de

su implantación, en el momento de su "recolecta") habitualmente no se incluye en los protocolos de los equipos dedicados a esta actividad debido a que la permanente disponibilidad del patólogo no viene compensada por la información obtenida en el estudio del tejido congelado. Por tanto, la viabilidad del hígado donante depende generalmente del juicio macroscópico que realiza el cirujano al resecarlo.

3°) Diagnóstico de la disfunción del injerto hepático: El síndrome de disfunción del injerto hepático viene definido como la alteración clínica o bioquímica en la función hepática de grado moderado o severo mantenida durante más de 48 horas. Las causas que producen disfunción del hígado trasplantado suelen ser de suficiente especificidad, por lo que se precisa la colaboración de la histopatología para su diagnóstico. La mayor, aunque no la única, aportación de la biopsia es el diagnóstico del rechazo [22,204], cuya evidencia morfológica exige reconsiderar la intensidad del tratamiento inmunosupresor.

4°) Control de calidad del programa: Los índices de supervivencia postrasplante y el grado de calidad de vida son los métodos adecuados para valorar el grado de éxito de un programa de trasplante hepático. Al patólogo le corresponde tabular las causas morfológicas del fallo del injerto para descubrir desviaciones de los criterios de indicación, oportunidad de variaciones en el tratamiento inmunosupresor e

idoneidad de las técnicas quirúrgicas. El estudio de las piezas hepáticas, obtenidas tras autopsia o tras hepatectomía del injerto en los retrasplantes debe ser reglado. Es recomendable un corte seriado del hilio, donde las lesiones secundarias a complicaciones quirúrgicas y a rechazo crónico son más objetivables.

5°) Nuevas técnicas histológicas: El apoyo que la histopatología moderna puede añadir a la terapéutica trasplantadora es también en investigación. Las técnicas inmunopatológicas y la biología molecular tienen su aplicación en la morfología microscópica y como herramientas pueden emplearse en las anteriores utilidades y en en el camino de la investigación clínica. Inmunohistoquímica e hibridación in situ (vide infra) son ahora y aquí métodos para controlar el curso clínico del trasplante y aportaciones novedosas al conocimiento biológico.

Junto a las actividades anteriormente mencionadas, la participación del patólogo en un programa de TxH tiene otra vertiente adicional: la de intentar identificar y definir cuales son las causas y mecanismos responsables de los distintos tipos de hepatopatías establecidos en el injerto hepático [225].

La obtención protocolizada de biopsias hepáticas sucesivas y piezas de hepatectomía del injerto (obtenidas por retrasplante o estudio autopsico) proporciona un amplio y rico material que permite estudiar de forma secuencial el curso de

las enfermedades en él desarrolladas. La posibilidad de poder realizar sobre dicho material, en concomitancia con el convencional estudio morfológico óptico, pruebas complementarias como ultraestructura, inmunohistoquímica, hibridación in situ y técnica de reacción en cadena de la polimerasa, ofrece la oportunidad de identificar determinadas estructuras celulares y virales a las que la histopatología convencional no tiene acceso. El ulterior análisis comparativo entre los cambios morfológicos presentes en el injerto y los datos obtenidos con las pruebas complementarias puede ayudar a comprender y definir algunas de las características de las hepatopatías establecidas.

Por consiguiente, es también misión del patólogo el intentar, en colaboración con los restantes servicios pertenecientes al programa de TxH, establecer mejores definiciones de algunas enfermedades hepáticas [225].

II.E) - Principales Complicaciones del TxH:

El periodo postoperatorio inmediato o intrahospitalario, de unas 6 semanas de duración como promedio, suele estar acompañado por numerosas complicaciones de muy diversa indole. Trás el alta, los pacientes también pueden presentar complicaciones en cualquier momento, pero éstas son tanto menos frecuentes cuanto más tiempo transcurre desde el trasplante [167].

Entre las principales causas de pérdida del injerto

durante la primera semana está el **fallo primario**, que consiste en la ausencia de funcionamiento del hígado trasplantado. El retrasplante urgente es la única opción terapéutica válida para esta grave complicación.

También en estas fechas postrasplante pueden ocurrir complicaciones en la perfusión hemática. Aunque en cualquiera de las anastomosis vasculares pueden ocurrir complicaciones, la más grave es la **trombosis de la arteria hepática**. Esta complicación vascular, más frecuente en niños que en adultos, puede condicionar insuficiencia hepática grave que puede motivar un retrasplante.

Las más frecuentes **complicaciones biliares** (algo más tardías) son las fugas o fístulas y las estenosis en la anastomosis de la vía biliar. Otros problemas biliares, menos habituales, son la colangitis y la coledocolitiasis.

El **rechazo** es la más frecuente complicación de los pacientes trasplantados hepáticos. Clásicamente el rechazo del hígado trasplantado se divide en **agudo** y **crónico**, pero son mejores denominaciones la de rechazo celular y rechazo ductopénico (respectivamente) [234].

La incidencia de **rechazo celular** (agudo) entre los pacientes con TxH se sitúa alrededor del 70% [1]. La mayoría se producen durante las primeras dos semanas, pero pueden iniciarse ya en el plazo de unos pocos días postrasplante. Las variables bioquímicas de función hepática aumentan en el rechazo celular, sin embargo, son de poco valor diagnóstico, ya que se ve una activación similar en las colestasis, las

colangitis, la toxicidad por drogas y en muchos otros estados de insuficiencia hepática [91]. Sólo puede llegarse a un diagnóstico exacto de rechazo celular a través de la biopsia hepática con evidencia de los cambios histológicos característicos (infiltrado celular portal mixto, lesión ductal y endotelitis) [30,31]. En la mayoría de casos, el rechazo celular es un proceso controlable con tratamiento adecuado, el cual consiste generalmente en la administración de glucocorticoides a dosis elevadas y/o de anticuerpos antilinfocitarios, especialmente monoclonales de tipo OKT3 [1].

El **rechazo ductopénico** (crónico) puede presentarse en cualquier momento del postoperatorio (incluso antes de los 3 meses post-TxH) y puede, en la mayoría de los casos, estar precedido por episodios de rechazo celular. La alteración bioquímica predominante es una colestasis. El cuadro histológico se caracteriza por lesiones de ductos (ductopenia del 50% y cambios epiteliales), una endoarteriopatía fibroobliterativa con o sin macrófagos espumosos, colestasis y atrofia centrolobulillar [31]. El único tratamiento del rechazo ductopénico y vasculopático que cursa con intensas alteraciones clínicas y biológicas es el retrasplante [167].

Las **infecciones** son uno de los problemas más frecuentes de los pacientes con TxH y, en general, están relacionados con la inmunosupresión, con la intervención quirúrgica o con las maniobras invasivas acompañantes. La mayoría de los microorganismos responsables de la infección postoperatoria en el trasplante hepático son bacterias (especialmente bacilos

gram negativos y estafilococos), aunque un número notable de infecciones son causadas por hongos (*aspergillus fumigatus* y *candida* sp), por virus del grupo herpes (citomegalovirus y herpes simples) y por parásitos (*Toxoplasma* y *Pneumocystis carinii*). Las infecciones constituyen la principal causa de mortalidad en los pacientes con TxH [110,167].

Son posibles las **recidivas** de patología tumoral en el injerto cuando la resección del hígado nativo ha sido indicada en pacientes con hepatocarcinoma u otro tumor hepático maligno o el análisis morfológico los ha descubierto tras su resección. En el periodo posterior a los 100 primeros días es más frecuente que se plantee si la disfunción hepática se debe a una recidiva de enfermedad vírica (hepatitis) previa. Los virus de la hepatitis B, D y C pueden originar en el injerto todos los cuadros morfológicos que son capaces de causar en el hígado no trasplantado. También se ha referido casos de recidiva de cirrosis biliar primaria [30,31].

III. EL CITOMEGALOVIRUS EN RECEPTORES DE TxH

III.A) La infección viral oportunista:

La disfunción hepática, entendida como una elevación de la tasas séricas de bilirrubina y/o de enzimas hepáticos durante más de cuarenta y ocho horas, es inespecífica en el paciente trasplantado hepático. Es decir, puede ser debida a múltiples etiologías: ataque inmune (rechazos), infecciones, complicaciones técnicas (patología biliar y vascular), toxicidad medicamentosa, recurrencias, etc [30,31,42,62,235].

El rechazo y la infección son dos de las más frecuentes etiologías de la disfunción hepática y son consideradas las dos barreras más importantes interpuestas al éxito de un trasplante. Son además dos procesos íntimamente ligados: el rechazo por si mismo puede producir la reactivación y la potenciación de ciertas infecciones (sobre todo las de origen viral) y, por otro lado, el incremento del tratamiento inmunosupresor para controlar dicho rechazo es un factor potenciador del desarrollo de infecciones [173]. Así, el diagnóstico de ambas complicaciones debe ser lo más específico posible porque condiciona conductas terapéuticas distintas.

La biopsia debe determinar la existencia de los episodios y de los tipos de rechazo y puede ser de importancia en el diagnóstico de las infecciones oportunistas. Los respectivos cuadros microscópicos que permiten esta labor se han caracterizado en los últimos años [30,31,62,64,147,164,191].

Las infecciones oportunistas del paciente trasplantado

hepático pueden ser por bacterias, hongos y virus [23,34,98, 110,229]. Los agentes infecciosos pueden tener varios orígenes para acceder al huesped susceptible: organismos endógenos procedentes del mismo receptor, patógenos transmitidos por el órgano trasplantado o por productos sanguíneos administrados durante la cirugía, y por último, organismos presentes en el agua, el aire y los alimentos con los que el paciente trasplantado se pondrá en contacto tras el trasplante [109].

A finalizar el primer mes postoperatorio el paciente entra en el periodo de máxima inmunosupresión y de mayor riesgo de padecer infecciones por agentes "oportunistas". En general las bacterias convencionales dejan de ser importantes según nos vamos alejando del momento del trasplante y las **"virasis oportunistas"** adquieren un papel relevante [110].

Las infecciones virales también pueden ser detectadas por biopsia hepática [195]. Cuatro virasis oportunistas presentan los mayores problemas clínicos en los pacientes trasplantados: citomegalovirus (CMV) [18,38,192], virus del herpes simple (HSV) [79,105], virus de Epstein-Barr (EBV) [16,108,115,165] y adenovirus [102,180].

III.B) Infección y Hepatitis por CMV en TxH:

El CMV es el virus oportunista más frecuentemente diagnosticado en los pacientes trasplantados hepáticos. La infección por CMV es ya peligrosa por si misma, pero el virus parece además desempeñar un importante papel como potenciador

de la inmunosupresión y de la inducción de determinadas formas de rechazo por mecanismos no totalmente aclarados [109,137].

Existen tres posibles orígenes de la infección por CMV en el paciente trasplantado: 1º) el órgano donante 2º) la sangre transfundida y 3º) la reactivación de virus endógenos [98]. La infección activa puede ser primaria (primoinfección) cuando se demuestra CMV en un paciente que antes del trasplante presentaba anticuerpos anti-CMV negativos, puede ser reactivación del virus latente del huésped, o puede ser reinfección por una segunda cepa viral del donante [212]. La primoinfección suele, eventualmente, dar lugar a una enfermedad clínica que tiende a ser más frecuente y más grave que la proceda por la reinfección o la reactivación [109].

La infección activa por CMV ocurre más frecuentemente en los primeros tres meses siguientes al trasplante. Se presenta en un número importante de pacientes sometidos a trasplante hepático: se describen incidencias de hasta el 85% de los pacientes [11,95,104,109,148,221]. De acuerdo con la experiencia adquirida en el trasplante de otros órganos estas cifras deben aproximarse al 100% si se alarga suficientemente el tiempo de seguimiento del paciente [69,109].

El propio injerto hepático es la más frecuente localización de la enfermedad por CMV tras el trasplante hepático [109,209,212], alcanzando cifras que oscilan entre el 4% y el 34,6% [38,48,53,147,160,161,187,192,212]. La **hepatitis por CMV** se caracteriza por fiebre, malestar, anorexia, colestasis, ictericia y una elevación de las transaminasas

séricas [212]. El diagnóstico clínico de hepatitis por CMV es concluyente cuando la disfunción del órgano trasplantado puede atribuirse al CMV [16,133,147]. Clínicamente la enfermedad hepática por CMV puede ser leve y autolimitada, como en otros pacientes con otros órganos trasplantados, pero se han descrito casos fatales o que han requerido retrasplante [18]. Es difícil determinar con seguridad cuando la mortalidad está determinada por el CMV, debido a la frecuente presencia de otras enfermedades coexistentes [48].

III.C) Factores de Riesgo de la Infección Activa y de la Enfermedad por CMV:

Muchos estudios han pretendido establecer asociaciones causales o determinar factores de riesgo en los pacientes trasplantados hepáticos para la infección activa y/o la enfermedad por CMV [18,48,50,63,69,109,152,161,187,228]. Algunos posibles factores de riesgo como la edad, el sexo, la enfermedad de base o el grado de compatibilidad del injerto pueden ser importantes, pero no o muy difícilmente modificables [2,210].

La transfusión de sangre o de derivados hemáticos de los donantes con infección latente (seropositivos) puede constituir un mecanismo de contagio, pero el riesgo de infección por unidad de sangre transfundida varía ampliamente [88]. Algunos autores consideran que esta posible vía de adquisición del virus tiene poca importancia práctica en el contexto del trasplante hepático [109,187,212]. En cualquier caso, aceptando

que la posibilidad existe, se sabe que la transfusión de sangre libre de leucocitos disminuye el riesgo de transfusión de virus [106]. Sería deseable que se usaran sangre y derivados hemáticos procentes de donantes seronegativos para receptores igualmente seronegativos [48]. Sin embargo, esto no resulta fácil considerando la alta incidencia de CMV en la población general adulta.

Aunque, la situación de retrasplante hepático sea considerada por algunos autores [148,212] un factor predictivo de la infección por CMV, no se observa una concordancia general en la literatura sobre el tema y siguen siendo necesarios más estudios.

Se han estudiado factores predictivos de infección [38,109,212,228] como los estados serológicos propios del CMV en donante y en receptor, la intensidad de la inmunosupresión, el tipo y el sinergismo de los fármacos inmunosupresores, etc. Cuando no existen desacuerdos en cuanto a considerar a estos datos como factores de riesgo para la enfermedad y/o hepatitis por CMV es frecuente encontrar muy variables opiniones y distintos resultados en la incidencia y en la valoración de su importancia. Aunque los protocolos y las políticas de actuación terapéutica y/o preventiva desarrollados en los distintos programas mundiales de TxH tienden a unificarse, las opiniones, acuerdos, discordancias y controversias precisan contrastarse con la propia experiencia. Es por ello que estos aspectos de la bibliografía se comentarán en la discusión enfrentándolos a nuestros propios resultados.

III.D) Profilaxis de la Infección por CMV:

Algunos de los factores de riesgo más importantes son inevitables en la práctica médica, por lo que es necesario recurrir a métodos para prevenir la infección y enfermedad por CMV en el paciente trasplantado.

Actualmente, las principales estrategias para la prevención de la infección por CMV en la población de pacientes trasplantados son:

a) **la inmunización pasiva (inmunoglobulina):** En la última década algunos estudios han mostrado que la inmunoglobulina (Ig) puede modificar el desarrollo de la infección y de la enfermedad por CMV [2,196]. Sin embargo los resultados no son uniformes. En estudios prospectivos en pacientes trasplantados renales, la administración profiláctica de hiperinmunoglobulina ha reducido en 50% la enfermedad primaria por CMV [56]. Sin embargo no se consiguió reducir la tasa de infección por CMV aunque se redujo globalmente el número de infecciones oportunistas y fue mayor la supervivencia del injerto y del paciente entre aquellos que recibieron esta inmunoprofilaxis [196]. Ese efecto protector disminuyó cuando se ampliaba la inmunosupresión, principalmente con la administración posterior de OKT3 [196]. Entre los pacientes con trasplante de médula ósea parece demostrado que el uso prolongado de Ig (hiperinmune o no) reduce la incidencia de neumonía por CMV [124].

Con respecto al beneficio de la Ig en los trasplantes hepático y cardíaco, la información disponible es todavía muy

escasa y se basa en trabajos realizados con pocos pacientes y generalmente sin grupos control [177,178]. El mecanismo de protección de la Ig no está todavía bien aclarado [169]. Recientes estudios de costo-eficacia sugieren que la Ig debería reservarse para los pacientes de alto riesgo de padecer infección y enfermedad de inclusión citomegálica, ya que sigue siendo dudosa su eficacia en el resto de pacientes [220].

b) los inmunomoduladores (interferón): El interferón (IF) se ha usado como agente profiláctico antivírico [2]. La administración de interferón leucocitario (IF alfa) en pacientes con trasplante renal demostró retraso de la excreción de CMV y reducción del número de viremias y de infecciones sintomáticas por CMV, incluso en pacientes que eran seropositivos previamente al trasplante [25,81]. Sin embargo, el interferón obtenido de fibroblasto (IF beta) no ha sido útil en el contexto del trasplante renal y el interferón leucocitario no ha sido de ninguna ayuda en el contexto del trasplante de medula ósea [122]. Debido a estas discrepancias y a sus numerosos efectos adversos (leucotrombocitopenia, fatiga) y, sobre todo, a su acción potenciadora de las reacciones "injerto contra huésped" y posiblemente de los rechazos, su empleo en la profilaxis vírica está en entredicho [2].

c) la inmunización activa (vacunas): No existe una vacuna para el CMV universalmente aceptada, en parte por la imposibilidad

de comprobar que fueran seguras y de que no produjeran enfermedad en el paciente que las recibe. Plotkin et al [156] ha constatado el efecto favorable de la vacunación con una cepa de virus vivo atenuado en la prevención de la enfermedad por CMV de los trasplantados renales. Aunque se han intentado realizar vacunas con otras cepas de CMV, la más estudiada ha sido la vacuna elaborada con la cepa Towne, que produce respuestas humorales y celulares adecuadas en personas normales. En estudios a doble ciego, los autores arriba referidos encontraron entre los vacunados un número significativamente menor de infecciones graves que en los no vacunados [156]. La supervivencia del injerto también fue superior en los pacientes que habían sido vacunados. Sin embargo, la tasa global de infección por CMV, como sucede con el uso de la Ig, no se modificó.

d) los fármacos antivíricos: El éxito del aciclovir en el tratamiento de infecciones por otros herpesvirus distintos del CMV ha representado un triunfo de la quimioterapia antiviral. Sin embargo el aciclovir tiene mucho menos actividad contra la infección por CMV en el paciente trasplantado que en el paciente no portador de injertos [48]. Recientemente se ha confirmado que el aciclovir es de importancia profiláctica a pesar de su dudosa capacidad terapéutica. Ello se ha confirmado en estudios de pacientes con trasplantes renal y de pacientes con trasplante de médula ósea con evidente disminución de las cifras de enfermedad por CMV [10,124]. A diferencia de lo que

sucede con la Ig o con la vacuna anti-CMV, el uso profiláctico de aciclovir no sólo ha sido capaz de reducir la tasa de enfermedad en el grupo de pacientes seronegativos que recibe órgano de trasplante seropositivo, sino también, aunque en menor grado, en el resto de los pacientes que han sufrido reinfección o reactivación por CMV. Además, con este fármaco se ha conseguido reducir la tasa global de infección por CMV y mejorar la supervivencia del injerto [10,124].

La experiencia preliminar favorable con el uso profiláctico de aciclovir en la infección por CMV sugiere que el empleo de otros fármacos antivíricos mas potentes in vitro frente a CMV, como el ganciclovir o el foscarnet, podría también resultar eficaz [2]. Hasta ahora, sólo se ha utilizado profilácticamente el ganciclovir en un escaso número de ensayos no controlados y con pocos pacientes [95]. Los resultados preliminares han sido similares a los obtenidos con aciclovir. El ganciclovir, sin embargo, es más tóxico que el aciclovir y exige su administración por vía intravenosa, lo que puede dificultar su empleo. Varios grupos de trabajo están realizando estudios dirigidos a evaluar la utilidad del ganciclovir en la profilaxis de la infección por CMV en el paciente trasplantado [2,95]. Hasta este momento no existe experiencia en el empleo profiláctico de foscarnet en la infección por CMV.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS METODOLOGICAS:

Por nuestro trabajo asistencial previo se pueden emitir las siguientes **hipótesis**:

- Muchos pacientes con TxH se infectan por CMV o reactivan su infección previa.
- En ellos puede presentarse un cuadro de hepatitis por CMV que puede influir de forma negativa en el éxito de esta terapéutica.
- La biopsia, que habitualmente se usa como medio diagnóstico de los variados tipos de disfunción del injerto hepático, puede descubrir este agente viral por simple estudio HE y/o aplicando en el corte histológico nuevas técnicas detectoras de antígenos del CMV o de su DNA.

Para obtener los objetivos que a continuación se plantean ha sido preciso investigar la incidencia de este virus, correlacionar los hallazgos anatomopatológicos con los datos microbiológicos (cultivos convencionales y rápidos de productos biológicos), redefinir los criterios histológicos diagnósticos de esta hepatitis y poner a punto las técnicas específicas de IHQ e HIS, así como valorar sus propios rendimientos. Todo ello con la idea de conocer la influencia de la infección por CMV en esta población de pacientes por medio de un seguimiento clínico, virológico y morfológico.

OBJETIVOS:

- 1 - Conocer la incidencia, los factores de riesgo y la evolución de la Hepatitis por CMV en los pacientes con injertos hepáticos así como la incidencia microbiológica general al protocolizar la búsqueda de infección activa.
- 2 - Describir el cuadro histológico que permite reconocer inequívocamente tal tipo de hepatitis.
- 3 - Definir las lesiones microscópicas definitivas y confirmar etiológicamente los cuadros histológicos similares o sugestivos, pero incompletos, utilizando técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) o de hibridación in situ (HIS).
- 4 - Establecer la sensibilidad y utilidad de estas técnicas que combinan morfología, inmunopatología y biología molecular.

PACIENTES, MATERIAL Y METODOS

I - PACIENTES:

I.A) Muestra Total:

Se realizó revisión y seguimiento de los pacientes trasplantados hepáticos en el Hospital Universitario "12 de Octubre", en Madrid, durante un período de 69 meses (desde el comienzo del Programa en abril de 1986 a diciembre de 1991). Se hicieron 244 trasplantes en 198 pacientes. Se retrasplantó en 37 ocasiones (RTXH). Ocho pacientes necesitaron un tercer trasplante y un único paciente recibió un cuarto trasplante.

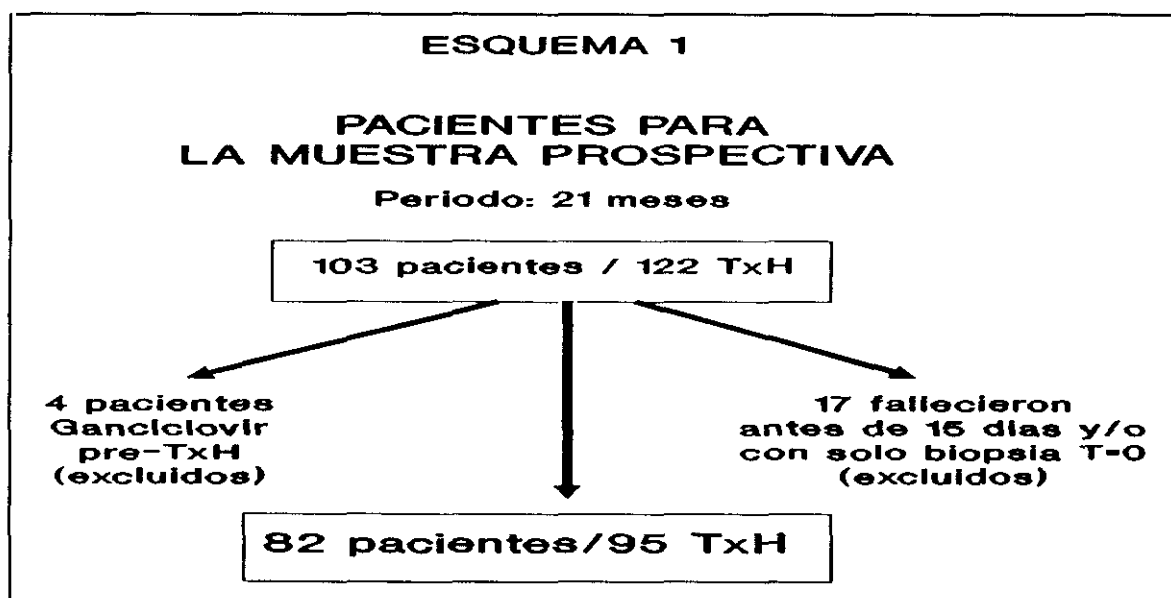
Del total de injertos se obtuvo el material anatomopatológico utilizado en el presente estudio que correspondió a 191 TxH realizados en 160 pacientes con un total de 1022 biopsias hepáticas.

Los criterios para la inclusión del injerto en esta serie fueron: supervivencia superior a 15 días, disponibilidad de biopsias de seguimiento y ausencia de uso profiláctico de tratamiento antiviral pretrasplante. Estos criterios se siguieron también en la muestra prospectiva que es parte de esta denominada **muestra total** y que pasa a explicarse seguidamente.

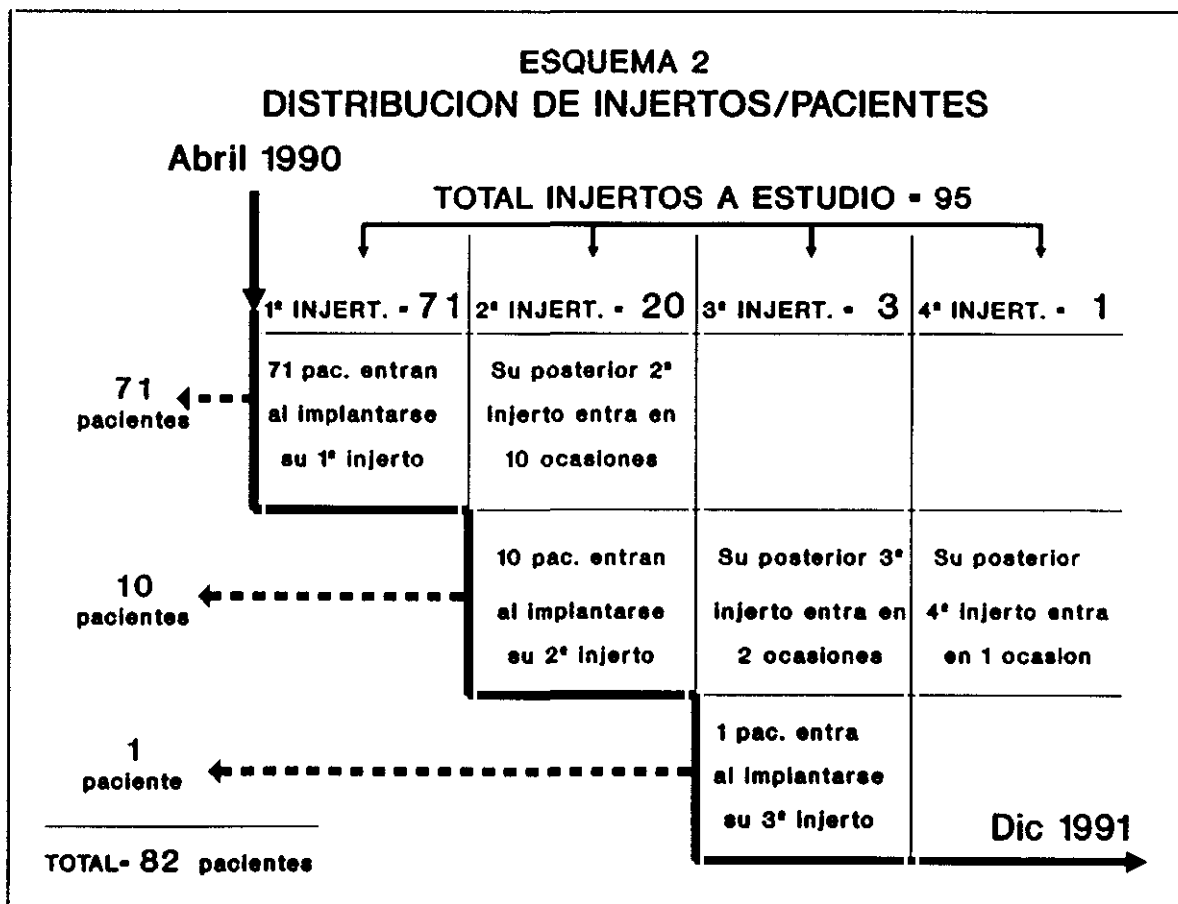
I.B) Muestra Prospectiva Clínico Patológica:

Con la finalidad de tener una población homogénea y unos caracteres de estudio completos para el estudio epidemiológico

y el analisis de los factores de riesgo, se protocolizaron PROSPECTIVAMENTE (Esquema 1.) los pacientes trasplantados hepáticos en ese hospital durante el periodo de abril/90 a diciembre/91 (21 meses). Durante ese periodo se realizaron 122 intervenciones de TxH en 103 pacientes, se excluyeron 17 pacientes que fallecieron antes de 15 días postrasplante y aquellos cuyas biopsias hepáticas se limitaron a las del día del TxH y a los 8-15 días postrasplante, así como 4 pacientes que recibieron Ganciclovir profilático antes del acto quirúrgico. Por tanto, el material definitivo para el estudio prospectivo epidemiológico quedó integrado por 82 pacientes con 95 TxH.



Entre ellos hubo 24 episodios de retrasplante, incluyendo 20 RTXH, 3 RRTXH y 1 RRRTXH, pero once pacientes fueron estudiados solo a partir del segundo o tercer trasplante. Tres pacientes fueron descartados anteriormente por el primer injerto y continuaron perteneciendo a nuestra muestra total como pacientes, una vez que tuvieron los requisitos exigidos en el retrasplante. Los demás pacientes han sido retrasplantados después de la fecha inicial del estudio prospectivo. Una explicación comprensiva se expone en el Esquema 2.



La distribución etaria fue: 72 pacientes adultos y 10 niños. Se consideraron como niños los pacientes hasta 14 años, siguiendo los criterios utilizados en este hospital. Fueron varones 55 y mujeres 27.

Las indicaciones de TxH de los 82 pacientes fueron distribuidas en cinco diferentes categorías siguiendo la clasificación de Demetris et al [159]: **Categoría I:** Enfermedades Colestáticas Crónicas (**ECC**), que incluyen pacientes con Cirrosis Biliar Primaria (n=5), Atresias de Vías Biliares (n=4) y Cirrosis Biliar Secundaria (n=1). **Categoría II:** Enfermedades Parenquimatosas Crónicas (**EPC**) que incluyeron pacientes con Cirrosis Poshepatítica (n=24), Cirrosis Etílica (n=10), Cirrosis Criptogénica (n=4), Cirrosis Autoinmune (n=3), Deficiencia de Alfa-1-antitripsina (n=1) y Enfermedad de Wilson (n=1). **Categoría III:** Enfermedades Parenquimatosas Agudas (**EPA**) que incluyen Hepatitis Fulminante con Necrosis Masiva y/o Submasiva (n=8). **Categoría IV:** Enfermedades Neoplásicas del Hígado (**ENH**) que incluyen pacientes con Hepatocarcinomas asociados a Cirrosis Poshepatíticas o a Cirrosis Biliar Primaria (n=7). **Categoría V:** grupo Miscelanea (**Misc**) constituida por pacientes con Síndrome de Budd-Chiari (n=1), Hígado Malformativo (n=1) y Tirosinemia en fase cirrótica (n=1).

A las citadas categorías de indicaciones de TxH se añadieron los 11 injertos que fueron estudiados a partir del segundo o tercer trasplante (**Retrasplantes**).

En el periodo postrasplante se obtuvieron muestras de

sangre, orina y exudado faríngeo para cultivo vírico convencional en tubos y para detección rápida de CMV en viales: 1) cada siete días, hasta el segundo mes, y posteriormente 2) uno por mes a partir de esa fecha y, además 3) siempre que las circunstancias clínicas lo hicieron conveniente.

Se estableció el estado serológico basal en todos los receptores y donantes mediante la determinación de anticuerpos anti-CMV. En el caso del receptor, la muestra de suero fué extraída en el mismo día del trasplante (Tiempo 0, T=0).

El protocolo de obtención de biopsias hepáticas (vide infra) en el Programa alcanzó alto grado de seguimiento. En la mayoría de los casos se consiguió una muestra durante el acto quirúrgico (Muestra T=0) y durante la segunda semana de postoperatorio, independiente de la evolución clínica, como medida de control histológico (T=8/15 días). También se realizó biopsia siempre que el paciente presentó síndrome de disfunción hepática (elevación notable de enzimas y/o bilirubina sérica de más de 48 horas de duración).

El **protocolo de inmunosupresión** aplicado consistió en: 1) Ciclosporina A hasta alcanzar niveles séricos entre 300 y 500 ng/ml, 2) Metilprednisolona intravenosa con dosis inicial de 10 mg/Kg y continuación posterior con 2 mg/Kg/día durante los dos primeros días postoperatorios, disminuyendo progresivamente hasta estabilizar la dosis en 0,2 mg/Kg/día y 3) ATGAM (globulina antitímocítica) con dosis de 8 mg/Kg/día durante 8 días, o Azatioprina con dosis inicial de 2mg/Kg/día, repartido en dos tomas durante 8-10 días y después 1 mg/Kg/día

durante tres meses. La elección entre estos dos últimos fármacos dependió del número de plaquetas o de leucocitos circulantes y del estado funcional renal. Los episodios de rechazo se trataron con un máximo de 3 bolos de 10 mg/Kg/día de esteroides intravenosos. La ausencia de respuesta llevó a utilizar ATGAM, 8 mg/Kg/día durante 10 a 15 días y si no se normalizó la función, anticuerpos monoclonales anti-OKT3, 5 mg/Kg/día durante 10 días o retrasplante. A partir de 1990 (septiembre) se utilizó Ganciclovir siempre que se administró OKT3 (en los pacientes de rechazo agudo que no respondía a otra terapéutica inmunosupresora adicional).

II - MATERIAL:

II.A) Material Viroológico:

Para determinar la prevalencia de la infección latente y de la infección activa por CMV en los pacientes trasplantados hepáticos se ha recurrido a los resultados serológicos (anti-CMV) de los donantes y de los receptores, así como a la protocolización de la búsqueda de CMV en los productos biológicos (sangre, orina y esputo) de la muestra prospectiva de pacientes, a través del cultivo vírico convencional en tubos y de la detección rápida de CMV en viales.

II.B) Análisis de Factores de Riesgo:

En los pacientes que constituyeron el grupo prospectivo (82 pacientes) se han recogido datos para el análisis de los considerados posibles factores de riesgo para la adquisición de la infección y de la hepatitis por CMV, tales como: 1) tipo de hepatopatía terminal prétrasplante, 2) situación de retrasplante hepático, 3) serología anti-CMV del donante y del receptor, 4) otras patologías concomitantes objetivadas en el injerto y 5) la utilización terapéutica de anticuerpos monoclonales anti-OKT3.

II.C) Material Anatomopatológico (Muestra Anatomopatológica Total):

El material anatomopatológico disponible correspondiente a la muestra total de 191 TxH consistió en 1022 biopsias. Las

biopsias de tiempo "0" fueron excluidas, por lo que, de ese total de muestras nuestro estudio se centró en 853 biopsias hepáticas percutáneas con aguja de Menghini.

Para el procesamiento histológico, los fragmentos tisulares se fijaron en formol tamponado al 10%, fueron incluidos en parafina y posteriormente cortados a 4 micras. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE), tricrómico de Masson, Wilder para reticulina, PAS con previa digestión por diastasa, azul de Prusia de Perls, orceína modificada de Shikata y Rodanina. Uno de los cortes siempre se procesó con la técnica de Inmunohistoquímica (IHQ) de detección de CMV. En todos ellos, antes de la fijación, se tomó un fragmento en fresco para cultivo viral.

Del total de especímenes que constituyen el material tisular se protocolizó la búsqueda de CMV en:

- 1) Todas las biopsias hepáticas con diagnóstico anatomopatológico **sugestivo o concluyente** de infección por CMV (Vide infra).

- 2) Todas las biopsias hepáticas con **IHQ anti-CMV positiva**.

- 3) Aquellas biopsias (sin inclusión, sin cuadro "sugestivo" y sin IHQ positivas) realizadas **dentro de los 15 días anteriores o posteriores** a las que eran concluyentemente diagnósticas o sugestivas de infección por CMV.

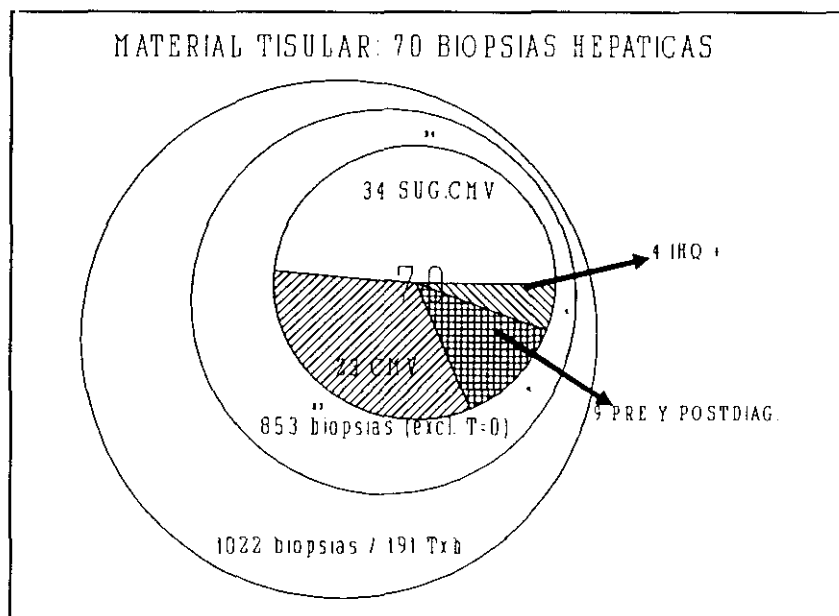
De las 853 biopsias 70 fueron seleccionadas para este estudio. Correspondían a 42 pacientes y en todos los casos hicimos personalmente las siguientes técnicas para su valoración y estudio (Gráfico 1):

1) Estudio al Microscópico Optico en el material, incluido en parafina y teñido con hematoxilina-eosina (al menos 3 secciones).

2) Estudio Inmunohistoquímico por técnica de inmunoperoxidasa mediante método complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC).

3) Hibridación in situ en tejido hepático desparafinado mediante sonda DNA específica anti-CMV.

GRAFICO 1. GRUPO DE ESPECIMENES SELECCIONADOS PARA EL ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO.



III - METODOS:

III.A) Detección Viroológica Prospectiva:

El estado serológico de los donantes y receptores se estableció mediante la determinación de anticuerpos anti-CMV con técnica inmunoenzimática indirecta (Diamedix.Corp.) y aglutinación de partículas de latex sensibilizadas (CMV scan latex agglutination test, Becton-Dickinson, Cockeysville Massachusetts,USA).

Para el cultivo convencional en tubos y la detección rápida en viales se utilizaron monocapas frescas de fibroblastos MRC-5 preparadas en el laboratorio. Los tubos se incubaron durante un mínimo de 15 días a 37°C en fase estacionaria y la presencia de CMV se puso de manifiesto por la aparición del efecto citopático característico. Con la técnica rápida en viales (dos por muestra), la presencia del virus en cultivo se detectó en 24-48 horas con anticuerpos monoclonales fluorescentes (Syva Microtrak) dirigidos contra los antígenos víricos tempranos expresados en el núcleo del fibroblasto infectado, según la técnica utilizada por Jespersen et al [96] (FIG.1).

III.B) Estudio por Microscopía Optica Convencional:

Se revisaron los 70 especímenes de tejido hepático seleccionados teñidos por Hematoxilina-Eosina (HE) buscando valorar los cambios histológicos y los diagnósticos anatomo-

patológicos.

a) Cambios Histológicos:

En ficha específica se recogieron los siguientes cambios histológico:

. Inclusión:

- Valoración semicuantitativa, expresada mediante cruces:
 - + : escasas (menos de 5 por biopsia)
 - ++ : frecuentes (entre 5 y 10 por biopsia)
 - +++ : abundantes (más de 10 por biopsia)
- Localización intracelular:
 - nuclear
 - citoplasmática
- Tipo de célula comprometida:
 - hepatocitos
 - epitelio biliar
 - endotelio
- Infiltrado inflamatorio en torno de células con inclusión

. Focos Inflamatorios Diseminados (FID), clasificados segun el:

- tipo de celularidad inflamatoria: leucocitario, mixto, granulomatoso.
- pudiéndose observar biopsias con foco de un solo tipo o con focos de multiples tipos.

. Cambios Hepatocitarios:

- anisocariosis, anisocitosis, hipercromatosis, mitosis y cuerpos acidófilos.

Cada uno de estos cambios se valoró como ausente (-) o presente (+). Se elaborará una base de datos con los cambios reseñados en las citadas fichas, utilizando el programa informático D.base 3.

b) Diagnósticos Anatomopatológicos:

Según los criterios que a continuación se detallan se asignó a cada muestra uno o más de los diagnósticos histológicos siguientes:

. Hepatitis por CMV: Presencia de inclusiones nucleares y/o citoplasmáticas y de acúmulos inflamatorios focales mixtos y diseminados sin preferencia por una zona o localización lobulillar [31].

. Sugestivo de Virasis Oportunista: Presencia de los acúmulos inflamatorios arriba descritos, no coincidiendo con la detección de inclusiones en la muestra.

. Rechazo Agudo (celular): Infiltrado portal mixto, con lesión ductal y/o endotelitis que se graduó según la metodología de Snover et al [193].

. **Rechazo Crónico (ductopénico):** Endarteriopatía fibroobliterativa con o sin macrófagos espumosos, lesión de ductos (ductopenia del 50% y cambios epiteliales), colestasis y atrofia centrolobulillares [234].

. **Patología Isquémica:** Objetivación de áreas infárticas focales, o de necrosis isquémica centrolobulillar o de estasis venoso como habitualmente son valorados en las biopsias hepáticas [31].

. **Patología Biliar:** Pigmento biliar lobulillar con o sin cambio hidrópico hepatocitario centrolobulillar [31].

. **Cambios Mínimos:** Cuando los cambios microscópicos no son de intensidad, ni de especificidad suficientes como para identificar un patrón lesional característico [31].

III.C) Estudio Inmunohistoquímico:

Técnica de inmunoperoxidasa mediante método avidina-biotina-peroxidasa complex (ABC) para objetivar positividad nuclear y/o citoplasmática para CMV.

. Material en parafina:

Se obtienen secciones de 4-5 micras mediante un microtomo rotatorio convencional, montándose sobre portaobjetos con adhesivo celular. Se dejan secar al aire y después permanecen

de un día para otro en estufa a 37 grados, para favorecer la adherencia de la sección, no usándose temperaturas mayores para evitar daños antigénicos.

. Anticuerpo usado:

Anticuerpo monoclonal específico anti-CMV de ratón, clon CCH2 que reconoce los antígenos temprano y tardíos (DAKO - CMV, cod.M757) .

. Buffers usados:

Se ha utilizado como buffer o tampón el fosfato salino tamponado (Phosphate Buffered Saline: PBS), 0,01M, a pH 7.2 y preparado como sigue: a un litro de agua destilada se añade 1,48g de fosfato sódico dibásico anhidro, 0,43g de fosfato potásico mono básico anhidro y 7,2g de cloruro de sodio. Tras cada nuevo elemento añadido se agita la disolución hasta conseguir que no quede poso. Una vez preparado se comprueba el pH mediante pHmetro convencional, ajustando si es necesario.

La disolución así preparada se conserva en refrigerador hasta su uso, controlándose siempre el pH antes de utilizarse. El tiempo medio de vida es de un mes, aunque debido al gran volumen de trabajo de nuestro departamento se prepara cada 1-2 días.

. Preparación del cromógeno:

Dado que la enzima marcadora usada es la peroxidasa, utilizamos 3,3 diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) como cromógeno, ya que su densidad y resistencia a los alcoholes y xilol (permitiendo la deshidratación y por ello el montaje

permanente con mejor apreciación de la morfología), la hacen muy adecuada. Se prepara en el momento de usarla, porque su vida média es corta, disolviendo en 20ml de TRIS 0,05M a pH 7,6, 10 mg de DAB (Sigma, St.Louis, MO, USA; D-5637), y añadiendo después 0,2ml de agua oxigenada al 1%. Se filtra y se pone sobre las secciones a teñir.

. Técnica de Inmunotinción:

Se usa el método avidina-biotina-peroxidasa complex de Hsu, ligeramente modificado [93].

A) Suero normal (no inmune) de caballo (Vector, Burlingame, Ca, USA; S-2000), 1:50 en PBS, al objeto de disminuir las adherencias inespecíficas de inmunoglobulinas y evitar tinción de fondo.

B) Anticuerpo policlonal biotinilado anti-IgG de ratón preparado en caballo (Vector, Burlingame, Ca, USA; BA-2000) a 1:200, diluido en PBS con 5% de suero no inmune de caballo. El anticuerpo viene en viales de 1,5mg de polvo liofilizado, que se reconstituye con 1 ml de agua destilada.

C) Complejo avidina-biotina-peroxidasa modificada. Este complejo se prepara 30 minutos antes, usando el Kit Vector Elite (Vector, Burlingame, Ca, USA; PK-6100) que consta de un vial de avidina-DH (marcado com A) y un vial de peroxidasa biotinilada modificada (marcada como B) diluyendose en el mismo PBS a una concentración de 1:50 cada uno de los viales: por ejemplo, 100 lambdas de A y 100 lamdas de B en 5 ml de PBS. Es importante dejar transcurrir 30 minutos tras la mezcla pues es

necesario este tiempo para que se forme el complejo tridimensional activo.

.Realización de la técnica:

1. Si las secciones estaban en estufa, se sacan y se dejan a temperatura ambiente así como el resto del material a usar.

2. Desparafinado en xilol absoluto, 15 minutos.

3. Hidratación en alcohol etílico decreciente (absoluto, 90 y 70 grados), 5 minutos cada uno de los pasos.

4. Sobre el porta y alrededor de la sección se dibuja un círculo mediante el lápiz DAKOpatts, Glostrup, Dinamarca; S-2002), que da una lámina de un polímero plástico hidrófobo, que evita el desparramamiento de las soluciones por el porta, asegurando una cantidad adecuada y uniforme de reactivo sobre la sección.

5. Inhibición de la peroxidasa endógena con agua oxigenada al 0,5% en metanol absoluto, durante 5 minutos. Esta solución debe prepararse en el acto.

6. Lavado en PBS, 5 minutos.

7. Las secciones son sometidas a proteólisis con Proteasa VII (Sigma, St.Louis, MO, USA; P-8038) preparada al 0,1% en PBS, durante 2 minutos a temperatura ambiente (t.a.).

8. Lavado en PBS, 5 minutos.

9. Incubación con suero normal de caballo, 20 minutos a t.a., después decantación del suero y se procede el siguiente paso sin lavado.

10. Incubación con el anticuerpo primario adecuadamente

diluido durante una hora a t.a.

11. Lavado con PBS, 5 minutos.
12. Incubación con anticuerpo anti-ratón biotinilado, durante 30 minutos a t.a.
13. Lavado con PBS, 5 minutos.
14. Incubación con complejo avidina-biotina-peroxidasa modificado durante 30 minutos a t.a.
15. Lavado con PBS, 5 minutos.
16. Incubación con la solución cromógena de DAB, 10 minutos a t.a., recién preparada.
17. Lavado en agua corriente, 5 minutos.
18. Contratinción nuclear con Hematoxilina convencional muy suave. En nuestro medio es suficiente 1 minuto.
19. Lavado abundante en agua corriente, 5 minutos. Deshidratación en alcohol etílico creciente (70,90 y absoluto) y aclarado en xilol absoluto, 5 minutos cada paso.
20. Montaje permanente en medio sintético: DPX (BDH Chemicas, Poole, Inglaterra; n. 36029).

. Valoración de las tinciones:

Se ha realizado una valoración semicuantitativa, expresada mediante cruces:

- 0: no tinción
- +: escasas células (menos de 5 por biopsia)
- ++: frecuentes células (entre 5 y 10 por biopsia)
- +++ : abundantes células (más de 10 por biopsia)

Se valoraron las tinciones definidas y claras, con fondo limpio y transparente, desenchandose aquellas tinciones muy débiles, o bien aquellas más intensas pero con fondo aparente, que fueron repetidas. No se valora la intensidad de la tinción ya que esto es altamente subjetivo y muy dependiente de las variaciones diarias de la técnica. No obstante, en algunos casos llamativos se tiene en cuenta.

Se consideró también la distribución topográfica de la tinción: citoplasmática y/o nuclear, y dentro de esta última la morfología y tamaño de los nucleos teñidos.

. Controles de las técnicas:

A) Control negativo:

Su función es detectar alteraciones del tejido en estudio que produzcan tinciones inespecíficas o bien alteraciones en el sistema de detección (anticuerpo biotinizado, complejo avidina-biotina-peroxidasa, cromógeno).

Para ello se usaron secciones de tejidos conocidamente negativos que fueron inmunoteñidos de forma similar a las secciones en estudio, no debiéndose obtener tinción si la técnica está bien hecha.

B) Control positivo:

Su función es chequear el adecuado comportamiento del anticuerpo usado y secundariamente del sistema de detección. Para ello se usan secciones de tejidos conocidamente positivos. Estas secciones son inmunoteñidas de forma similar a los casos en estudio y si la tinción es correcta, los pasos de la técnica

han sido correctos.

III.D) Estudio por Hibridación in situ:

Se realizó la técnica de hibridación in situ con la utilización de un "kit" (ENZO-PathoGene, n°32872, Syosset,NY) que consta de:

Vial 1. Sonda DNA específica anti-CMV biotinilada en buffer ClNa/EDTA conteniendo formamida y facilitador de hibridación.

Vial 2. Reactivo post-hibridación, 1 x 3ml en buffer conteniendo formamida.

Vial 3. Reactivo de detección, 1 x 1ml complejo avidina-biotina peroxidasa en buffer ClNa/EDTA.

. Material en parafina:

Se obtienen secciones de 4-5 micras mediante un microtomo rotatorio convencional, montándose sobre portaobjetos comercialmente tratados con 3-aminopropiltriethoxilano (Chemika, 09324, Suiza) y con agujeros delimitados. Se dejan secar al aire y después permanecen de un día para otro en estufa a 37 grados.

. Buffers usados:

Se ha utilizado como buffer o tampón la solución de lavado de ENZO: 10mM PBS conteniendo 5mM ClNa/EDTA, preparado como sigue: a un litro de agua destilada se le añade contenido de un sobre previamente medido con ClNa/EDTA y se agita la

solución hasta conseguir que no quede poso. La solución se conserva en refrigerador hasta su uso. El tiempo medio de vida es de un mes.

. Preparación del cromógeno:

Se utilizó la 3,3 diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) y su método de preparación ha sido la misma descrita en la técnica de inmunohistoquímica (pag.14).

. Realización de la técnica:

1. Las secciones, que estaban en estufa, se secan y se dejan a temperatura ambiente así como el resto del material a usar.

2. Desparafinado en xilol absoluto, 15 minutos.

3. Hidratación en alcohol etílico decreciente (absoluto, 90 y 70 grados), 5 minutos cada uno de los pasos.

4. Inhibición de la peroxidasa endógena con agua oxigenada al 0,5% en metanol absoluto, durante 5 minutos. Esta solución debe prepararse en el acto.

5. Lavado en buffer, 5 minutos.

6. Las secciones son sometidas a proteolisis con Proteinasa K (BRL,MD20877.USA) preparada al 6% en buffer inmediatamente antes de emplearlo. Los portas ya con el tejido permanecen sumergidos en esta solución dentro de la estufa a 37 grados, durante 15 minutos.

7. Lavado en buffer, 5 minutos.

8. Se deshidratan las preparaciones en alcoholes a diferentes grados de concentración.

9. Secar las preparaciones a temperatura ambiente o en estufa a 37 grados, durante 10 minutos.

10. Las secciones son sometidas a desnaturalización con sonda DNA (vial 1) utilizando una placa calefactora a 92 grados, durante 5 minutos. Antes del calentamiento de las preparaciones tisulares se coloca el cubreobjetos de cristal sobre cada sección con el fin de disminuir las variaciones de la temperatura por las corrientes de aire y así crear un ambiente de temperatura más uniforme.

11. Retirar los portaobjetos de la placa calefactora y dejar en la estufa a 37 grados, durante 20 minutos, para que ocurra el proceso de hibridación del DNA. Retirar los cubreobjetos suavemente.

12. Aplicar el reactivo post-hibridación (vial 2) y dejar en estufa a 37 grados, durante 30 minutos.

13. Lavado con buffer, 10 segundos.

14. Para la detección de la sonda se utiliza el reactivo de detección (vial 3) y las secciones se incuban a 37 grados, durante 30 minutos.

15. Lavado con buffer, 10 segundos y escurrir.

16. Incubación con la solución cromógena de DAB, 10 minutos a temperatura ambiente, recién preparada.

17. Lavado en agua corriente, 5 minutos.

18. Contratinción nuclear con Hematoxilina convencional muy suave. En nuestro medio es suficiente 1 minuto.

19. Lavado abundante en agua corriente, 5 minutos. Deshidratación en alcohol etílico creciente (70°, 90° y

absoluto) y aclarado en xilol absoluto, 5 minutos cada paso.

20. Montaje permanente en medio sintético: DPX (BDH Chemicas, Poole, Inglaterra; n°36029).

Los criterios de valoración de las tinciones y la utilización de controles de las técnicas fueron los mismos que los utilizados en la técnica de inmunohistoquímica (vease anteriormente).

III.E) Glosario de términos diagnósticos:

. **Infección Latente por CMV:** Se consideró infección latente cuando el donante o receptor demostraron anticuerpos anti-CMV en el suero.

. **Infección Activa por CMV:** Se aceptó que existía infección activa cuando ocurrió cualquier aislamiento de CMV en fluido y/o tejido y/o conversión serológica.

. **Infección Activa Asintomática:** La infección activa fué asintomática cuando se obtuvo un cultivo positivo de fluidos o secreciones y/o seroconversión sin clínica de infección.

. **Infección Activa Sintomática:** Se consideró que esta infección activa era sintomática **-Enfermedad Clínica-** cuando se demostró por cultivo y/o histología la presencia del virus en fluido o en algún órgano (pulmón, hígado, colon, etc) y, **simultaneamente**, existía fiebre, con artromialgias, con o sin leucotrombocitopenia, y con sintomatologías constitucionales.

. **Hepatitis por CMV:** Se denominó hepatitis por CMV la

detección del virus en tejido hepático por histología (HE y/o IHQ y/o Hibridación in situ) o por cultivo de dicho tejido (Cultivo convencional en tubos o detección rápida en viales). La biopsia había sido indicada por disfunción del injerto.

III.F) Estudio Estadístico:

El procesamiento de los datos y el análisis estadístico se realizó, en las distintas fases de su proceso de ejecución, en el Centro de Proceso de Datos de la Universidad Complutense de Madrid.

El tratamiento estadístico de los resultados se realizó con dos métodos distintos según la calidad de los datos obtenidos en este estudio:

1) Para la comparación de resultados epidemiológicos, demográficos y factores de riesgo obtenidos de la **muestra prospectiva** se utilizó un test de Chi-cuadrado. Cuando las cifras eran de pequeña magnitud se empleó la prueba exacta de Fisher.

2) Para el estudio estadístico del conjunto de informaciones (variables) obtenidas del estudio histológico de las 70 biopsias hepáticas que constituyen el grupo extraído de la **muestra total** se construyó una base de datos. También, desde aquí, se utilizó un test de Chi-cuadrado para:

. Verificar cuales fueron las variables histológicas que caracterizaron el cuadro clásico de hepatitis por CMV y un cuadro "sugestivo de hepatitis por CMV".

. Comparar las características histológicas de los dos

cuadros referido a través de estudio convencional (HE).

. Comparar los resultados de las tres técnicas histológicas utilizadas (HE, IHQ e HIS) en cuanto a sensibilidad, fallos, localización del virus y número de células afectadas.

Se consideró como significativo un valor de "p" (probabilidad) igual o inferior a 0,05 ($p \leq 0,05$) [35]. Para ambas fases del análisis estadístico se utilizó el programa BMDP [13].

RESULTADOS

I - RESULTADOS EPIDEMIOLOGICOS Y DEMOGRAFICOS:

Para obtener los resultados epidemiológicos y demográficos, así como los factores de riesgo de la infección y de la hepatitis por CMV, se ha recurrido a la muestra prospectiva que ofreció completa cumplimentación del protocolo y evitó la pérdida de casos.

I.A) Incidencia General de Infección y de Hepatitis por CMV:

Entre el grupo prospectivo de 95 TXH en 82 pacientes:

- 1- Se detectó CMV en alguno de los productos biológicos en 49 pacientes (59,8%) lo que constituye la cuantía total de pacientes con **infección** sistémica demostrada.
- 2- Se demostró la presencia de CMV en el tejido del injerto hepático (**hepatitis**) en 16 TXH (16,8%) correspondientes a 16 pacientes (19,5%). El seguimiento biopsico de esos pacientes ha sido 235 ± 149 (intervalo 23-537) y el tiempo medio en que se detectó CMV fue 48 ± 22 días postrasplante (intervalo 23-114) (Tabla 1).

TABLA 1: Incidencia de Infección y de Hepatitis por CMV

número de	% Infección (n°+)	% Hepatitis (n°+)
TxH (95)	53,7 (52)	16,8 (16)
Pacientes (82)	59,8 (49)	19,5 (16)

I.B) Edad y Sexo:

Eran adultos 72 pacientes del total y 10 eran niños. Entre los primeros, se diagnosticó CMV en el injerto en 13 ocasiones (18%) y, entre los niños, 3 de los injertos estuvieron afectados (30%). Aunque se haya observado un mayor porcentaje de hepatitis por CMV entre los niños (Tabla 2), la diferencia no fue significativa estadísticamente ($p=0,3718$). Tampoco se demostró diferencia significativa entre las cifras de incidencia por sexo en el estudio estadístico de la distribución de esos pacientes ($p=0,3065$) (Tabla 3).

TABLA 2: Distribución Etária de Infección y de Hepatitis CMV

Edad	Pacientes n°	Infección % (n°/T)	Hepatitis % (n°/T)
Adultos	72	59,7 (43/72)	18,0 (13/72)
Niños	10	60,0 (6/10)	30,0 (3/10)

T= total de casos

TABLA 3: Distribución por sexo de Infección y de Hepatitis CMV

Sexo	Pacientes n°	Infección % (n°/T)	Hepatitis % (n°/T)
Varones	55	63,6 (35/55)	18,2 (10/55)
Mujeres	27	51,8 (14/27)	22,2 (6/27)

T= total de casos

I.C) Confrontación entre si de datos microbiológicos con el diagnóstico anatomopatológico:

La incidencia de infección activa antes citada se han obtenido de los resultados positivos en la búsqueda microbiológica protocolizada de CMV en sangre, orina, frotis faringeo y líquido broncoalveolar. La viremia fue el dato más

TABLA 4: Datos virológicos (cultivos de CMV) pre y post- demostración histológica de hepatitis.

n°pacientes hepatitisCMV	san gre	ori na	FF	LBA	DAP	san gre	ori na	FF	LBA
n° 1	si	-	-	-	H E P A T I T I S C M V	si	si	si	-
n° 2	-	si	si	-		-	si	-	-
n° 3	si	si	-	-		-	si	-	-
n° 4	si	-	-	-		si	-	si	-
n° 5	-	si	-	-		si	-	-	si
n° 6	si	-	-	-		-	-	-	-
n° 7	si	-	-	-		si	-	-	-
n° 8 *	-	-	-	-		-	-	-	-
n° 9	si	si	-	-		si	si	-	-
n° 10	-	-	-	-		-	si	-	-
n° 11	si	si	si	-		-	-	-	-
n° 12 *	-	-	-	-		-	-	-	-
n° 13	-	-	-	-		-	si	-	-
n° 14	-	-	-	-		-	si	-	-
n° 15	-	si	-	-		-	si	-	-
n° 16	-	-	-	-		-	si	-	-
Total	7	6	2	0		5	9	2	1

* pacientes comentados en el texto

FF= frotis faringeo; LBA = líquido broncoalveolar; DAP= diagnóstico anatomopatológico.

frecuentemente demostrativo de la infección activa entre las exploraciones en estos cuatro productos biológicos antes del diagnóstico morfológico de hepatitis por CMV (Tabla 4). Debe hacerse notar en este apartado la objetivación de una deficiente sensibilidad de esta habitual búsqueda protocolizada según programa (vease Método): En dos pacientes (n°8 y n°12) con diagnóstico anatomopatológico (DAP) de hepatitis por CMV documentado en HE y/o IHQ y/o HIS no se había detectado CMV en ninguna de sus otras muestras biológicas. Ello demuestra que se obtiene una infravaloración de la incidencia de infección general por estos métodos microbiológicos y la incidencia así hallada debe entenderse como la mínima objetivable.

II- FACTORES DE RIESGO DE INFECCION Y DE HEPATITIS POR CMV:

Se exploraron como posibles factores las siguientes características de la serie:

II.A) La Indicación del Trasplante Hepático:

La distribución de las indicaciones del trasplante en los 82 pacientes (Tabla 5), incluyendo los 11 segundos o terceros injertos, según la clasificación en categorías diagnósticas de Demetris et al [159], mostró que la hepatitis por CMV fue significativamente más frecuente entre los pacientes con previa hepatitis fulminante (=EPA en Tabla 5) que entre aquellos con otra hepatopatía previa ($p=0.0194$).

TABLA 5: Incidencia de Hepatitis CMV en relación con la Indicación de TxH

Hepatopatías Terminales pre-TxH	Pacientes n°	Hepatitis CMV % (n°)
ECC	10	30,0 (3)
EPC	43	9,3 (4)
EPA	8	62,5 (5)
ENH	7	14,3 (1)
Misc	3	33,3 (1)
Fallo 1° o 2° TxH	11	18,2 (2)

ECC- Enf. colestática crónica, EPC- Enf. parenquimatosa crónica, EPA- Enf. parenquimatosa aguda, ENH- Enf. neoplásica hepática, MISC- Grupo miscelánea.

II.B) Retrasplante Hepático:

En la Tabla 6 se aporta la incidencia de hepatitis por CMV distribuida según el ordinal del injerto en los 95 trasplantes de la muestra total que incluyó 71 primeros injertos, 20 segundos, 3 terceros y 1 cuarto. No se observó mayor número de episodios de hepatitis por CMV en los retrasplantes (24 injertos) cuando se comparó con el número de los ocurridos en los 71 primeros injertos (10,0% vs 19,7%).

TABLA 6: Relación entre Hepatitis por CMV y Retrasplante

Ordinal Injerto	número injertos	% Hepatitis (n°)	
1° Injerto	71	19,7	(14)
2° Injerto	20	10,0	(2)
3° Injerto	3	0	(0)
4° Injerto	1	0	(0)
Total	95	16,8	(16)

II.C) Los anticuerpos séricos antiCMV (Serologías) preTxH en donante y en receptor:

El apareamiento por posibilidades de serología (positiva/negativa) entre donante y receptor determina cuatro grupos de pacientes (Tabla 7).

El enfrentamiento estadístico de las diferencias de incidencia de infección y de hepatitis entre estos grupos ha mostrado:

. es un factor de **riesgo de infección** por CMV la combinación "donante+/receptor-" en relación con las

combinaciones donante+/receptor+, donante-/receptor+ y donante-/receptor- ($p=0,001$).

. es un factor de riesgo de hepatitis por CMV la combinación "donante+/receptor-" en relación con las combinaciones donante+/receptor+, donante-/receptor+ y donante-/receptor- ($p=0,0056$).

TABLA 7: Incidencia de Infección y Hepatitis CMV en relación con estados serológicos (antiCMV) preTxH de donante y receptor

D/R	n° TxH	% Infec. (n°+)	% Hepat. (n° +)
Grupo +/-	6	100,0 (6)	66,7 (4)
Grupo +/+	79	54,4 (43)	13,8 (11)
Grupo -/+	9	33,3 (3)	11,1 (1)
Grupo -/-	1	0,0 (0)	0,0 (0)

D/R= donante/receptor

II.D) Otras patologías objetivadas en el injerto:

Entre las patologías diagnosticadas previamente a la detección de CMV en el injerto hepático se observó que las 16 hepatitis por CMV objetivadas en esta muestra prospectiva fueron precedidas por, al menos, un episodio de rechazo agudo ($p=0,0339$) (Tabla 8). Con respecto a las patologías biliar e isquémica, entre los 16 pacientes con hepatitis por CMV en 3 existió un solo diagnóstico previo de patología biliar y en 3 existieron diagnósticos previos de patología isquémica. (Tablas 9. y 10.)

TABLA 8: Hepatitis por CMV en relación con Episodios previos de Rechazo Agudo

Rechazo Agudo Prévio	Hepatitis CMV	
	Si	No
Si	16/77	61/77
No	0/18	18/18
Total	16/95	79/95

p=0,0339

TABLA 9: Hepatitis por CMV en relación con Patología Biliar previa

Patol. Biliar Prévía	Hepatitis CMV	
	Si	No
Si	3/26	23/26
No	13/69	56/68
Total	16/95	79/95

p=0,3965

TABLA 10: Hepatitis por CMV en relación con Patología Isquémica previa

Pat. Isquémica Prévía	Hepatitis CMV	
	Si	No
Si	3/10	7/10
No	13/85	74/85
Total	16/95	81/95

p=0,2243

II.E) La administración de anticuerpos monoclonales anti-OKT3 (inmunosupresión adicional):

Para verificar la posible implicación del uso de anticuerpos monoclonales anti-OKT3 en el desarrollo de un cuadro de infección y/o en el establecimiento de la enfermedad por CMV en el injerto hepático se aprovechó un cambio en la política de uso de los anticuerpos monoclonales anti-OKT3 en el período de recogida de estos datos prospectivos. Este tipo de inmunosupresión adicional se utilizó frecuentemente en los 60 primeros casos de esta muestra (Tabla 11.) debido a que su uso era de elección libre (no protocolizado) en cualquier caso de rechazo agudo. Posteriormente, en los 35 siguientes injertos de esta serie, tal inmunosupresión adicional se protocolizó limitándose exclusivamente para aquellos rechazos corticoresistentes. Con el menor uso de ese tratamiento (de 50,0% a 8,6% injertos) se ha observado una significativa disminución de la prevalencia de la infección (de 71,7% a 25,7% injertos) ($p=0,0001$), y de la hepatitis por CMV (23,3% a 5,7% injertos) ($p=0,0001$), aunque la ocurrencia de episodios de rechazo agudo permaneció básicamente inalterada ($p=0,8839$).

TABLA 11: Relación entre el uso de OKT3 y la ocurrencia de RA previo a la Infección y a la Hepatitis por CMV en los injertos (n°95)

	TxH n°	Infección % (n°)	Hepatitis % (n°)	OKT3 % (n°)	RA % (n°)
1° Grupo	60	71,7 (43)	23,3 (14)	50,0 (30)	81,0 (49)
2° Grupo	35	25,7 (9)	5,7 (2)	8,6 (3)	82,0 (29)

III - RESULTADOS ANATOMOPATOLOGICOS:

La revisión histológica de las 853 biopsias disponibles (muestra total) de los 191 injertos (160 pacientes) produjo un grupo de 70 especímenes seleccionados al seguir los cuatro criterios descritos en Material y Métodos y esquematizadas en la Gráfico 1.

III.A) Cuadro Histológico de la Hepatitis por CMV:

La **Hepatitis por CMV**, definida por la inclusión citomegálica, manifestó en 23(100%) biopsias un cuadro microscópico con las características listadas en la Tabla 12 que también expresa su correspondiente incidencia porcentual.

Las inclusiones estuvieron siempre presentes en los hepatocitos pero se observaron también en el epitelio biliar y en el endotelio, si bien estos dos tipos celulares estaban afectados en menos de un tercio de los casos. Las inclusiones nucleares son las clásicamente descritas como masa eosinofílica o anfofílica rodeada de halo claro que la separa de la cromatina rechazada a la membrana nuclear (Cowdry A) (FIG.3).

En el estudio de las inclusiones hepatocitarias, además de la constante afectación del núcleo en este grupo de biopsias, también se observó frecuentemente un cambio citoplasmático en la gran mayoría de estos especímenes.

TABLA 12: Caracterización Histopatológica de la Hepatitis por CMV (HE) - 23 biopsias (100%) de 20 pacientes

Caract.Histológicas	N° Biopsias	(%)
INCLUSION	23	(100)
Tipo de Célula:		
Hepatocito	23	(100)
núcleo solo	3	(13,0)
citoplasma solo	0	(0,0)
ambos	20	(87,0)
Epit.Biliar	4	(17,4)
Endotélío	6	(26,1)
Reacción Inflamat. peri-inclusión:		
Sin	2	(8,7)
Con	6	(26,1)
Situación Mixta	15	(65,2)
FID	21	(91,3)
Tipo Celular:		
mixto	17	(73,9)
neutrofílico	8	(34,8)
linfocitario	0	(0,0)
lipogranuloma	2	(8,7)
inf.sinusoidal	1	(4,3)
granuloma	1	(4,3)
Unico	13	(56,5)
Combinado	8	(34,8)
CARACT.GENERALES		
Anisocariosis	12	(52,2)
Anisocitosis	9	(39,1)
Hipercromatismo	14	(60,9)
Mitosis	10	(43,5)

Consistió en un granulado basófilo denso en un abundante (citomegálico) citoplasma, que presentaba una morfología discreta y reconocible. Se interpretó como un acúmulo de productos virales y, por tanto, se denominó inclusión citoplasmática (FIG.4). Ambos tipos de inclusiones fueron observadas predominantemente en hepatocitos aunque, también

fueron detectadas en epitelio de ductos biliares y en células endoteliales (FIG. 5 y 6).

Además del carácter patognomónico de la inclusión nuclear, la alteración microscópica del tejido mostró característicamente un **Infiltrado Inflamatorio Diseminado** (91,3% de las biopsias con inclusión). Tal infiltrado se presentó mayoritariamente en focos (solo fue además difuso en un caso -infiltrado sinusoidal-). Estos focos eran múltiples en cada lobulillo, por lo que se consideró oportuno el término de **"focos inflamatorios diseminados"** para este cuadro histológico acompañante de las inclusiones virales. Los focos mostraron tendencia a localizarse en una determinada zona del lobulillo hepático, pudiendo verse centrales, mediozonales o periportales (FIG.7 y 8).

El tipo de célula inflamatoria de estos focos no siempre fue la misma. Se caracterizaron 2 tipos de focos (FIGS.9,10,11 y 12): exclusivamente leucocitarios (de polimorfonucleares) y mixtos (de leucocitos y linfocitos). Algunas biopsias mostraban un solo tipo de foco inflamatorio (leucocitario o mixto) pero no era infrecuente una combinación de la presencia de focos mixtos y de focos leucocitarios en el mismo cilindro. Granulomas perfectamente caracterizados con inequívocas células epitelioides solo se evidenciaron en 1 caso (FIG.13). Gotas grasas rodeadas de monocitos/macrófagos, sin carácter epitelioides, existieron en 2 casos.

Se realizó un estudio exhaustivo de la relación entre **inclusión y foco inflamatorio** en cada tejido. Se encontraron

todas las posibilidades: **a)** célula con inclusión sin infiltrado circundante **b)** célula con inclusión rodeada de infiltrado y **c)** infiltrado solo (sin inclusion en relación con este foco que tampoco la mostró en cortes seriados). Además, en la mayoría de las biopsias, existía una coincidencia de situaciones **a** y **b**.

Otros caracteres fueron **frecuentes** y se tabularon para incluirlos en el cuadro descriptivo: anisocariosis e hipercromatismo hepatocitarios estuvieron presentes en más del 50% de los casos sugiriendo relación con el agente patógeno. También se observaron mitosis típicas y anisocitosis en un relevante número de biopsias.

La **disfunción del injerto** que motiva la toma biópsica puede ser de etiología múltiple por lo que se estudió la coincidencia de otras alteraciones histológicas no atribuibles a CMV. Estas alteraciones permitieron en muchos casos otro diagnóstico anatomopatológico (DAP) sincrónico con el de Hepatitis por CMV en la misma biopsia (Tabla 13). En 10

TABLA 13: Diagnósticos Anatomopatológico asociados a Hepatitis por CMV en las 23 biopsias con CMV demostrado por HE

DAP Asociado	Número	(%)
Con Otro DAP	13	(56,5)
Rechazo Agudo	8	(61,5)
Pat. Isquémica	2	(15,4)
Rechazo Crónico	1	(7,7)
Pat. Biliar	1	(7,7)
Otra Virasis Oport.	1	(7,7)
Sin Otro DAP	10	(43,5)

biopsias (43.5%) el CMV fue la única alteración histológica que justificó la disfunción del injerto. Pero cabe resaltar que más

de la mitad de las Hepatitis por CMV se asoció con otro DAP característico de disfunción. El rechazo agudo fue el más frecuente DAP entre estas asociaciones de la Hepatitis por CMV. Un caso de rechazo crónico fue del tipo "acelerado" (acute vanishing bile duct syndrome) observado en el día 31 postTxH.

El día postTXH en que se diagnosticó la Hepatitis por CMV con inclusiones fue 43 ± 10 (intervalo 21-61 días).

III.B) Cuadro histológico SUGESTIVO de Hepatitis por CMV:

La presencia de focos inflamatorios diseminados sin preferente localización lobulillar que no evidenciaron inclusión en ninguna localización del tejido hepático biopsiado, a pesar de nuevos cortes teñidos con HE, se observó en 34 biopsias entre las 853 disponibles en la serie (FIG.14).

Un análisis de los focos inflamatorios (tipo de infiltrado, combinaciones) y de las otras características generales se expone en la Tabla 14.

Se realizó un estudio comparativo (Chi Cuadrado) de las frecuencias de cada cambio histológico en el grupo de biopsias con diagnóstico seguro (inclusión) de Hepatitis por CMV (III.A) y este grupo denominado **Sugestivo**, no hallándose diferencias significativas, o sea, las variables porcentuales se comportaron igual en ambos grupos a pesar de algunas diferencias de porcentajes.

También se realizó un estudio estadístico comparativo (comparación de proporciones) de la incidencia de los otros posibles diagnósticos de disfunción del injerto que se

asociaron en el grupo de biopsias con diagnóstico seguro y en el denominado **"sugestivo de hepatitis por CMV"** (Tabla 15). No se obtuvieron diferencias significativas que distinguieran ambos grupos como distintos en función de su asociación.

TABLA 14: Comparación de las Características Histológicas del Cuadro Sugestivo de CMV (34-100%) sin Inclusión y de las de la Hepatitis por CMV (23-100%).

Características Histológicas	Cuadro Sugestivo N°biop. (%)		Hepatitis CMV N°biop. (%)	
FID	34	(100)	21	(91,3)
Tipo Celular:				
mixto	17	(50,0)	17	(73,9)
neutrofílico	12	(35,3)	8	(34,8)
linfocitos	6	(17,6)	0	(0,0)
inf.sinusoidal	5	(14,7)	1	(4,3)
granuloma	4	(11,8)	1	(4,3)
lipogranuloma	1	(2,9)	2	(8,7)
Unico	24	(70,6)	13	(56,5)
Combinado	10	(29,4)	8	(34,8)
CARACT.GENERAL.				
anisocariosis	20	(58,8)	12	(52,2)
anisocitosis	13	(38,2)	9	(39,1)
hipercromat.	15	(44,1)	14	(60,9)
mitosis	11	(32,4)	10	(43,5)

El día **postTXH** en que se diagnosticó **"sugestivo de hepatitis por CMV"** fue 69 ± 66 (intervalo 7-373 días). La comparación de esta "media \pm desviación estandar" con la del cuadro diagnóstico mostró diferencia significativa ($p=0.012$).

Para valorar más definitivamente el grado de seguridad diagnóstica de estos cuadros "sugestivos" es preciso exponer previamente los resultados de las técnicas de inmunohistoquímica y de hibridación in situ en las biopsias de ambos grupos, tras cuyo apartado se reportarán los datos pendientes

al respecto (III.D).

TABLA 15: Comparación entre los Otros DAPs asociados a las 34 biopsias Sugestivas de Hepatitis por CMV y a las 23 de Hepatitis por CMV.

DAP Asociado	Sugestivo CMV (HE)		Hepatitis CMV (HE)	
	N°	(%)	N°	(%)
Con Otro DAP	29	(85,3)	13	(56,5)
RA	22	(75,9)	8	(61,5)
RC	0	(0,0)	1	(7,7)
Pat.Isquémica	1	(3,4)	2	(15,4)
Pat.Biliar	0	(0,0)	1	(7,7)
NCL	1	(3,4)	0	(0,0)
Hep.lobulillar	1	(3,4)	0	(0,0)
Otra Virasis	2	(6,9)	1	(7,7)
Camb.Mínimos	2	(6,9)	0	(0,0)
Sin Otro DAP	5	(14,8)	10	(43,5)
TOTAL	34	(100)	23	(100)

Test de Comp. de proporciones (p=0,36)

III.C) Resultados con las técnicas de Inmunohistoquímica (IHQ) e Hibridación in situ (HIS):

A las 70 biopsias seleccionadas se les ha aplicado la técnica de IHQ anti-CMV usando anticuerpos monoclonales (FIGS.15,16,17 y 18). La técnica de HIS mediante sonda DNA-específica para CMV ha sido utilizada en 69 especímenes (FIGS.19,20,21 y 22). No se realizó en un caso debido a la escasez de tejido.

Un total de 35 biopsias correspondientes a 27 pacientes fueron diagnosticadas de Hepatitis por CMV por uno o más de los tres métodos utilizados (HE, IHQ e HIS).

Las técnicas de IHQ y de HIS resultaron positivas tiñendo

las inclusiones y también tiñendo núcleos y/o citoplasmas que morfológicamente eran normales y que, sin embargo, albergaban antígenos virales (IHQ) o DNA viral (HIS).

La comparación de las cifras de positividad obtenidas por cualquiera de las técnicas divididas por el total de biopsias positivas permitió identificar la sensibilidad de cada método (Tabla 16). La IHQ resultó ser la más sensible identificando el 82,9% de los tejidos positivos mientras que la HIS detectó tan solo el 48,6% ($p=0.0323$). Como ejemplo práctico de estos índices de sensibilidad hay que hacer notar que en 10 biopsias de seis pacientes con IHQ positiva no se objetivaron inclusiones por el convencional examen histológico con HE. Sin embargo, es oportuno un análisis detallado de los datos ofrecidos por cada técnica antes de concluir que la IHQ es la técnica idónea.

TABLA 16: Comparación de Técnicas Histológicas: I- Sensibilidad (35 biopsias/27 pacientes)

Técnica Diagnóstica	Pacientes N° (%)	Biopsias (+) N° (%)	(s)
por HE	20 (74,1)	23 (65,7)	23/35 = 0,66
por IHQ	24 (88,9)	29 (82,9) *	29/35 = 0,83
por HIS	14 (51,9)	17 (48,6) *	17/35 = 0,49

(s) sensibilidad * $p=0,0324$ (IHQ/HIS)

En la Tabla 17 se hace un recuento de los fallos de cada método: **Todas las situaciones presentadas** con una, dos o tres técnicas positivas **han sido contempladas**. Tan solo 14 biopsias

de las 35 positivas lo han sido por las tres técnicas. En 8 biopsias la IHQ fue la única técnica que demostró el agente patógeno en tejido. Pero la contrapartida a tan alta sensibilidad es que en 4 biopsias que habían mostrado inclusión en HE, el estudio IHQ no evidenció ninguna célula positiva (portadora de antígenos del CMV) y en el corte utilizado para esta técnica tampoco apareció inclusión alguna.

TABLA 17: Comparación de Técnicas Histopatológicas: II- Distribución de biopsias segun las situaciones presentadas en su estudio con las 3 técnicas.

Situaciones posibles	HE	IHQ	HIS	Biopsias + N° %	
Situación A	+	+	+	14	(40,0)
Situación B	-	+	-	8	(22,8)
Situación C	+	+	-	5	(14,3)
Situación D	+	-	-	4	(11,4)
Situación E	-	-	+	2	(5,7)
Situación F	-	+	+	1	(2,9)
Situación G	-	+	NR	1	(2,9)

NR - No realizable

Se han analizados los siguientes datos para tratar de explicar las distintas sensibilidades de las tres técnicas valoradas y la posibilidad de falsos negativos:

- 1º) Tipo de célula portadora de productos del CMV (hepatocito, epitelio biliar, endotelio)
- 2º) Lugar celular que alberga el producto (nucleo, citoplasma, ambos)
- 3º) Tipo de producto viral identificado (antígenos virales inmediatos, tempranos y/o tardíos, DNA viral)

4°) Existencia o no de alteración de las características citológicas: citomegalia, inclusión nuclear, inclusión citoplasmática, morfología NORMAL.

5°) Cantidad del virus (DNA) o de sus productos (antígenos) o de sus consecuencias (alteraciones morfológicas - inclusión citomegálica).

TABLA 18: Comparación de Técnicas Histológicas: III-Distribución de biopsias por localización (núcleo/citoplasma) y Tipo de célula con CMV demostrado.

Tipo de célula	HE (23=100%) N° (%)		IHQ (29=100%) N° (%)		HIS (17=100%) N° (%)	
Hepatocito	23	(100)	29	(100)	17	(100)
núcleo solo	3	(13,0)	10	(34,5)	9	(52,9)
citopl.solo	0	(0,0)	1	(3,4)	0	(0,0)
ambos	20	(87,0)	18	(62,1)	8	(47,1)
Epit.Biliar	4	(17,4)	3	(10,3)	2	(11,8)
Endotelio	6	(26,1)	5	(17,2)	4	(23,5)

En la Tabla 18 se analizan los tres primeros factores: El hepatocito siempre está comprometido y alberga productos virales, mientras que una minoría de las biopsias ha presentado positividad en epitelio biliar y/o en endotelio. Coincidentes inclusiones citoplasmáticas y nucleares (HE) y coincidente presencia citoplasmática y nuclear de antígenos virales (IHQ) fueron las situaciones más frecuentes. Sin embargo, aunque fue predominante la situación nuclear del DNA viral (HIS), también pudo demostrarse dotación genética del CMV en el citoplasma. En los casos que hubo afectación de células del epitelio biliar

o de células endoteliales fue siempre difícil constatar con seguridad inclusiones citoplasmáticas.

El 4° factor, que se refería a la morfología normal o patológica de las células, es importante para explicar la mayor sensibilidad de la IHQ puesto que demuestra antígenos virales en núcleo y citoplasma de células normales morfológicamente; (que siempre pasarán desapercibidas en HE) (FIG.17). También la HIS evidenció 5 casos positivos que presentaban células sin alteraciones morfológicas en HE (FIG.20). Sin embargo su sensibilidad también en este grupo de casos fue significativamente menor ($p=0,0106$) que la IHQ. (Tabla 19)

TABLA 19: Comparación de Técnicas Histológicas: IV-Distribución de biopsias según presencia de células positivas con imagen citológica normal.

Técnicas Diagnósticas	Células "Normales" (+)		TOTAL
	Si	No	
IHQ	19	10	29
HIS	5	12	17

$p=0.0106$

El 5° factor (cantidad de producto viral) explicará los falsos negativos de la IHQ y de la HIS. Aunque la IHQ nos revela la positividad de células morfológicamente normales, frecuentemente una sola célula es positiva y a veces existe una sola inclusión en el corte del cilindro estudiado. En la Tabla 20 se expone la amplia variación en el número de células positivas por cilindro hepático estudiado y las diferencias inter-técnicas. La mínima positividad (1 a 5 células afectas)

es la fracción porcentual más alta (situación más frecuente) de todas las biopsias y en las 3 técnicas de demostración del CMV.

TABLA 20: Comparación de Técnicas Histopatológicas V: Distribución de las biopsias según el número demostrado de células con CMV por cilindro.

Técnicas Diagnóst.	(+)	(++)	(+++)	Total
	N° (%)	N° (%)	N° (%)	N° (%)
HE	12 (52,2)	7 (30,4)	4 (17,4)	23 (100)
IHQ	16 (52,2)	3 (10,3)	10 (34,5)	29 (100)
HIS	11 (64,7)	4 (23,5)	2 (11,8)	17 (100)

(+) menos de 5 células positivas

(++) entre 5 y 10 células positivas

(+++) más de 10 células positivas

El número de cortes disponible para cada tipo de estudio (HE, IHQ, HIS) es también un factor importante: debe tenerse en cuenta que la incubación con antisuero (IHQ) o con sonda de DNA (HIS) se realiza en un solo corte por motivos técnicos y económicos. Por el contrario, el estudio al microscópico óptico convencional se hace en múltiples secciones depositadas en un solo porta y además valorando más cortes teñidos con PAS diastasa, Masson, etc. La evidencia microscópica de la inclusión es tan obvia que es difícil que pase desapercibida al observador aún en técnicas histológicas distintas a la HE.

El tiempo postrasplante en que se demostró el CMV fue similar con las tres técnicas valoradas (Tabla 21). Entre el 20° y 90° día postrasplante es el periodo de riesgo hepático por CMV, con máxima incidencia entre el 40° y el 60°. Sin embargo es importante señalar la presencia de dos casos

extremos altos (outliers en estadística técnica) después del día 100° postTXH (día 114° y 373°). Estos 2 casos solo fueron demostrados por IHQ y han alejado el tiempo medio de diagnóstico por esta técnica, aunque la comparación inter-técnicas de estos datos no alcanzó significación estadística.

TABLA 21: Comparación de Técnicas Histopatológicas VI: Tiempo de Diagnóstico de Hepatitis por CMV en pacientes y por biopsias

Técnicas	N° Pac.	T°DAP (interv)	N° Biop.	T°DAP (interv)
HE	20	44±11 (21-61)	23	43±10 (21-61)
IHQ	24	47±19 (23-114)	29	59±62 (23-373)
HIS	14	47±15 (25-88)	17	50±15 (25-88)
Total +	27	46±19 (21-114)	35	59±57 (21-373)

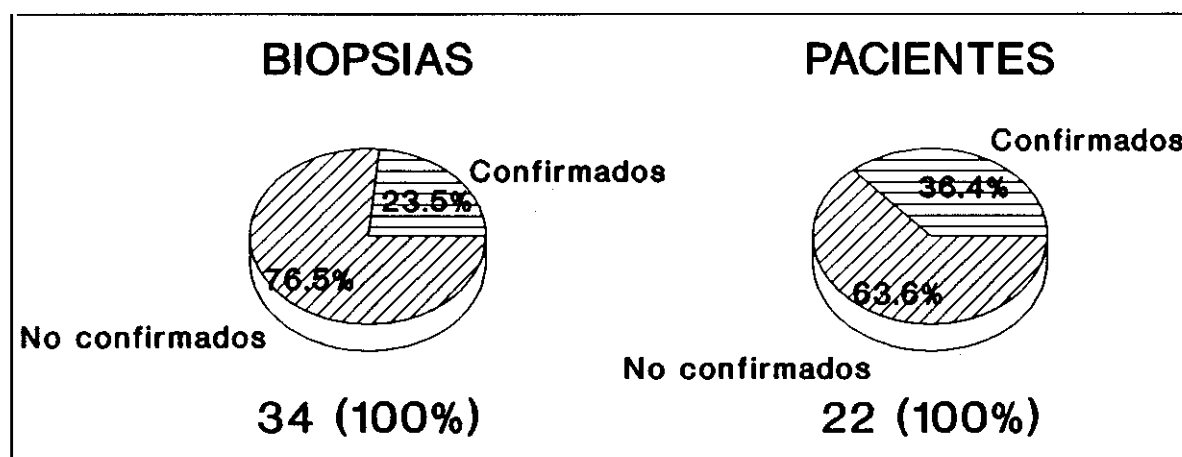
III.D) Grado de confirmación del Cuadro "SUGESTIVO de Hepatitis por CMV". Su patocronía:

Las 34 biopsias con criterios histológicos sugestivos de CMV pertenecían a 22 pacientes. Las técnicas de IHQ y/o HIS confirmaron inequívocamente la etiología por CMV en 8 biopsias (23,5%) correspondientes a 8 pacientes (36,4%). (Gráfico 2)

a) Cuadro "sugestivo" confirmado:

En la Tabla 22 se expone la técnica que ha confirmado el cuadro histológico **sugestivo** (6 por medio de IHQ y 2 por medio de HIS) como definitivamente diagnóstico de presencia de CMV en hígado.

GRAFICO 2: Porcentaje de biopsias y pacientes con cuadro histológico "Sugestivo de Hepatitis por CMV" confirmada.



También en esta Tabla 22 se han expuesto las biopsias de los citados pacientes que habían mostrado CMV en su injerto en algún periodo de su seguimiento. Tres pacientes no habían sido diagnosticados de infección CMV de su injerto si no se hubiera valorado este cuadro **"sugestivo"** y aplicado en sus biopsias las técnicas especiales (= no otras biopsias positivas). En los otros cinco se había diagnosticado CMV por la inclusión en HE de biopsias **previas**. El hecho de que el cuadro **sugestivo** de infección hepática por CMV se haya confirmado posteriormente a la objetivación previa de la Inclusión Citomegálica obliga a considerar la patocronia de este cuadro morfológico. Para ello es preciso ofrecer los resultados del análisis de los

cuadros sugestivos no confirmados.

TABLA 22: Seguimiento biopsico de los pacientes con Cuadro Sugestivo de Hepatitis por CMV confirmado por IHQ/HIS y día postTxH de sus biopsias.

Nº paciente	día postTXH	DAP (HE)	IHQ	HIS
nº 2	32	SUG*	+	N.R.
	42	SUG	-	-
nº 6	47	CMV	+	+
	54	CMV	+	+
	75	SUG*	-	+
	96	SUG	-	-
nº 12	67	SUG	-	-
	114	SUG*	+	-
nº 28	44	CMV	+	-
	58	SUG*	+	-
nº 30	30	SUG	-	-
	40	CMV	+	+
	373	SUG*	+	-
nº 31	55	CMV	+	-
	88	SUG*	-	+
nº 32	7	SUG	-	-
	36	CMV	+	+
	62	SUG*	+	-
	70	SUG	-	-
nº 37	21	SUG	-	-
	26	SUG*	+	-

* casos confirmados por IHQ y/o HIS
N.R. no realizado

b) Cuadro "Sugestivo" NO confirmado:

En 26 biopsias el cuadro histológico sugestivo de infección por CMV no se confirmó con las técnicas especiales.

TABLA 23: Seguimiento biópsico de los pacientes con CUADRO SUGESTIVO de Hepatitis por CMV NO CONFIRMADO por IHQ/HIS.

Paciente número	Día postTXH de Sug.CMV no conf.	CMV hepático en algun (día postTxH)	Intervalo entre Sug (-) y CMV
n° 2	42	SI (32)	- 10 días
n° 3	176/195	NO	
n° 5	39	NO	
n° 6	96	SI (75)	- 21 días
n° 8	29	NO	
n°11	43	SI (53)	+ 10 días
n°12	67	SI (114)	+ 47 días
n°13	8	NO	
n°14	64/79	NO	
n°16	25	NO	
n°21	40	SI (51)	+ 11 días
n°24	102	NO	
n°25	39	SI (68)	+ 29 días
n°26	69	NO	
n°29	30/40	NO	
n°30	30	SI (40)	+ 10 días
n°32	7	SI (36)	+ 29 días
	70	SI (62)	- 8 días
n°33	52/65	NO	
n°36	56	SI (37)	- 19 días
	86	SI (37)	- 49 días
n°37	21	SI (26)	+ 5 días

(-) = Sugestivo no confirmado posterior a CMV

(+) = Sugestivo no confirmado anterior a CMV

III.e) Evolución de la Hepatitis por CMV (Tabla 24):

La **permanencia** de la hepatitis por CMV se comprobó como máximo en 33 días (paciente n° 31) por demostración en sucesivas biopsias. Se observó **recidiva** en 1 paciente (n° 30) en el que mediaron 333 días entre los dos episodios de disfunción atribuida al CMV demostrado en su tejido hepático

TABLA 24: Evolución Histológica de los 27 pacientes con Hepatitis por CMV.

N° PAC	CMV(día)	B.Siguient.	Ultima B.	E.Actual
n°1	53	HCA (123)	Ci (729)	RTXH
n°2	32	RA (61)	HCA (803)	Muerto
n°4	54	PB (73)	PB+RC (250)	Muerto
n°6	47/54/75	RA (153)	RC (500)	RTXH
n°7	54/61	PB (78)	HCA (633)	Vivo
n°9	55	PB (89)	PB (89)	Vivo
n°10	41	RA (70)	Ci (519)	Muerto
n°11	53	RA (77)	RC (250)	RTXH
n°12	114	-	-	Vivo
n°15	59	ISQ+PB (169)	ISQ+PB (169)	RTXH
n°17	54	RA (90)	RC (283)	RTXH
n°18	21/35	-	-	Vivo
n°19	25	C.Mín. (81)	PB (142)	RTXH
n°20	31	RC (48)	RC (153)	RTXH
n°21	51	RA (73)	HSA (106)	RTXH
n°22	23	RA (40)	ISQ (89)	Muerto
n°23	32	RA (92)	RA (92)	Vivo
n°25	68	RC (96)	RC (141)	RTXH
n°27	38	PB (112)	RC (367)	Vivo
n°28	44/58	HCP (305)	HCP (305)	Vivo
n°30	40/373	RA (116)	RC (839)	Vivo
n°31	55/88	C.Mín. (379)	HCA (1381)	Vivo
n°32	36/62	RA (70)	C.Mín. (965)	Vivo
n°34	39	HCA (105)	HCA (371)	Vivo
n°35	45	Hlob. (55)	HCP (695)	Vivo
n°36	37	RA (86)	NCL (240)	Vivo
n°37	26	C.Mín. (43)	RC (313)	Vivo
Día	(46±19)	(107±76)	(416±324)	

y con 3 biopsias intermedias sin evidencia de este virus (diagnosticadas de rechazo agudo=factor de riesgo).

Se comprobó **remisión** de la Hepatitis por CMV en **todos** los casos: la siguiente biopsia a la última que diagnosticó CMV se realizó en un período posterior de 107 ± 76 días; fue motivada por otra disfunción hepática, pero sirvió también para comprobar la desaparición del CMV en todos los casos.

En esta serie, que cuenta con un seguimiento medio histológico de 416 ± 324 (última biopsia del injerto), no se observaron fallecimientos o pérdidas del injerto atribuibles a CMV (ausencia de CMV en este tejido hepático final).

El estado actual (al cierre del estudio) de los 27 injertos que sufrieron hepatitis por CMV muestra que 12 injertos permanecen funcionando y 13 injertos se perdieron (4 fallecimientos y 9 retrasplantes). La supervivencia actuarial al año de estos pacientes fue 85,2%. No existe diferencia significativa cuando este porcentaje se compara con el correspondiente en el Programa de Trasplante Hepático del Hospital 12 de Octubre en una muestra de 100 pacientes consecutivos (supervivencia del paciente = 74,2% al año).

El último estudio histológico de estos injertos demostró una ductopenia en más de un 50% de los espacios porta (criterio diagnóstico de rechazo crónico) en 9 casos. Se analizó estadísticamente la posible asociación entre infección por CMV del injerto y posterior evolución a rechazo crónico (Tabla 25). Se evidenció que la asociación es estadísticamente significativa ($p=0,04$).

TABLA 25: Contingencia de la asociación Rechazo Crónico y Hepatitis por CMV Previa, en los 191 injertos (100%).

Hepatitis CMV Prévia	Rechazo Crónico	
	Si (37)	No (154)
Si (27)	9 (4,7%)	18 (9,4%)
No (164)	28 (14,7%)	136 (71,2%)

p=0,04

DISCUSSION

I - INCIDENCIA DE INFECCION Y HEPATITIS POR CMV:

El desarrollo de anticuerpos séricos anti-CMV (indicativos de contacto previo con el CMV) es un hecho frecuente en la población general, cuya respuesta celular inmune es adecuada. La incidencia de infección aumenta conforme se avanza en edad, dependiendo también de las condiciones socioeconómicas y de desarrollo [82,109,210]. Las cifras de prevalencia de anticuerpos positivos en la población mundial se informan entre el 40% y el 100% [82,89,139]. También en España también las prevalencias muestran una amplia variación (entre el 50,8% y el 72,3%); ello es posiblemente dependiente del tipo de población estudiada por los distintos autores [7,140].

Entre los pacientes con trasplante hepático las cifras de **infección activa** por CMV oscilan entre 50% y 85% [11,48,50,95,101,104,109,148,154,221]. Nuestro resultado (59,8%) se sitúa dentro de este intervalo (Tabla 1). Al ofrecer este dato es preciso resaltar que las variaciones entre las cifras de los distintos autores dependen de los criterios utilizados para la selección de la población estudiada. Así: la edad considerada (adultos y/o niños), las fechas de supervivencia de los pacientes incluidos en el estudio (15, 30, 60 días postTx), la inmunosupresión utilizada, la inclusión o no de retrasplantes, la cantidad de muestras recogidas por protocolo para cultivo (sangre, orina, exudados), etc. En este estudio se incluyeron prospectivamente todos los pacientes sin profilaxis pre-

trasplante anti-CMV que sobrevivieron más de 15 días durante un mismo periodo de TxH o RTxH como se indicó en los criterios referidos en el apartado Material y Métodos.

El injerto hepático es el órgano que más frecuentemente se afecta en la enfermedad por CMV (**hepatitis por CMV**) durante el estado post-trasplante [109,195,212], alcanzando cifras que oscilan entre 4% a 34,6% [38,48,109,160,161,187,212]. En el presente estudio 19,5% de los pacientes presentaron un cuadro de hepatitis por CMV documentado por la biopsia hepática. Las variaciones de tasas de ocurrencia pueden deberse a: 1º) las distintas metódicas y protocolos de los distintos equipos, 2º) el empleo de unas u otras técnicas de diagnóstico, 3º) la ausencia de unos criterios definidos en los conceptos "infección", "enfermedad" y "hepatitis" cuando la etiología es CMV, 4º) la selección o la ausencia de selección de los donantes segun tengan o no serología positiva y se adjudiquen o no a receptores positivos o negativos y 5º) la existencia rutinaria, en el Banco, de exploración serológica específica de la sangre transfundida.

El comportamiento del CMV en los **niños** trasplantados hepáticos es de interés porque pueden responder distintamente a la infección por CMV y porque mayor proporción de ellos no estan previamente infectados por este virus (seronegativos) [16,50,101,180,181]. Además, en el intento de buscar un hígado de tamaño adecuado, muchos de los donantes son también niños, y por tanto con una mayor posibilidad de la combinación D-/R-. De hecho, la incidencia de hepatitis por CMV en la población

infantil trasplantada hepática se informa más baja que en la población adulta [160]. Sin embargo en esta serie la incidencia de hepatitis por CMV fue mayor entre los niños que entre los adultos (30% vs 18%) aunque la diferencia de porcentajes no resultó estadísticamente significativa. A pesar de ello, este resultado obliga a considerar las posibles causas de discordancia con la literatura: esta muestra de pacientes infantiles es escasa (10 casos) y la incidencia de un 30% proviene de 3 hepatitis por CMV; una sucedió en una combinación de serología anti-CMV D+/R-, otra en retrasplante tras fallo primario y la última en trasplante indicado por previa hepatitis fulminante. La situación de gravedad extrema, favorecedora de una reactivación viral, y en los 2 últimos explica el deslizamiento de este porcentaje hacia una cifra aparentemente discordante.

Las incidencias de infección y de hepatitis por CMV no mostraron diferencia significativa entre **varones y mujeres** (Infec.CMV 63,6% vs 51,8% - Hepat.CMV 18,2% vs 22,2%). Tales datos están en concordancia con los referidos, aunque pocos son los autores que abordan este tema epidemiológicamente [82,210].

La objetivación de **viremia** es el dato más predictivo de un posterior desarrollo de enfermedad por CMV entre las exploraciones utilizadas para determinar la reactivación de la infección latente o la primoinfección [4,11,40,109,125,187]. También en nuestros 16 pacientes con hepatitis por CMV fue la viremia el dato positivo más frecuentemente observado antes del diagnóstico biopsico (7 pacientes). Por el contrario la viruria

lo fue después de esta confirmación diagnóstica (Tabla 4). Es importante comentar que en dos de los 16 pacientes con hepatitis por CMV no se objetivó el CMV en ninguna muestra de cultivo antes o después del diagnóstico biópsico. Podría parecer que esta negatividad debe relacionarse con la frecuencia protocolizada de la recogida de muestras en este hospital, sin embargo Bronsther, O et al (1988) en el Pittsburg Health Center, han observado similar resultado en una serie de 17 pacientes: Dos de ellos no presentaron aislamiento positivo de CMV por cultivo en ninguna muestra durante la evolución de su hepatitis por CMV [18]. Los hechos comentados en este último párrafo apuntan hacia preeminencia del estudio histopatológico sobre los cultivos virológicos como medio de diagnóstico en la hepatitis por CMV.

II- FACTORES DE RIESGO DE INFECCION Y DE HEPATITIS POR CMV:

En nuestra población de pacientes trasplantados hepáticos se demostraron estadísticamente cuatro factores predictivos de riesgo para el desarrollo subsecuente de infección activa y/o hepatitis por CMV. Estas variables de riesgo han sido: 1) la hepatitis fulminante como hepatopatía terminal que indicó el TxH, 2) la seropositividad anti-CMV del donante en receptores seronegativos, 3) el rechazo agudo como dato de curso clínico y 4) el uso de anticuerpos monoclonales anti-OKT3 como inmunosupresión adicional para los RA corticoresistentes.

La mayor frecuencia de **hepatitis fulminante** previa (= EPA en Tabla 5) que se observó entre los pacientes que desarrollaron hepatitis por CMV fue demostrada como diferencia estadísticamente significativa. No ha sido referida en la literatura como factor de riesgo pero es conocida la situación de mayor gravedad en que estos pacientes son trasplantados [8,152]. Posiblemente una situación tan comprometida condicione una mayor posibilidad de reactivación del CMV.

La incidencia de infección activa y de hepatitis por CMV estuvo claramente relacionada con el **estado serológico** del donante y del receptor antes del TxH (Tabla 7). Enfermaron más (66,7%) los receptores que sufrieron una infección primaria (seronegativos que recibieron un órgano seropositivo) que las demás combinaciones donante/receptor en concordancia con la bibliografía revisada [109,212,228]. En la presente serie, cuando la combinación fue D+/R+ la incidencia de infección y

de hepatitis por CMV se mostró más alta que en la combinación D-/R+ (54,4% vs 33,3% para Infección y 13,8% vs 11,1% para Hepatitis). Recientemente se ha demostrado que la infección por CMV en los pacientes serológicamente positivos puede ser debida tanto la reactivación del CMV del huésped como a la adquisición de una nueva cepa de CMV procedente del donante [4,27,109,212]. Mediante análisis de restricción enzimática se ha comprobado que esta nueva infección (**reinfección**) puede ser más frecuente que la reactivación entre los receptores seropositivos con órgano de donante también seropositivo [4,27,76]. El órgano donante es la fuente más importante de transmisión de CMV [4,27,109,187,212] tanto en individuos seropositivos como en seronegativos. Ello sugiere que la infección primaria podría prevenirse si se utilizaran órganos de donantes seronegativos. Sin embargo, la elevada seroprevalencia de la infección en nuestra población, condiciona un escaso número de donantes de estas características y recomienda asumir este riesgo. Dicho riesgo puede ser disminuido si el equipo de trasplante hepático tiene los medios y la experiencia necesarios para reconocer tempranamente la enfermedad por CMV y para tratarla. En la experiencia previa de una situación similar como es el trasplante renal, Johnson et al [97] concluyeron que la gravedad y las consecuencias de la enfermedad por CMV no justificaban el denegar un órgano seropositivo a un receptor seronegativo. Hoy día este problema ha sido también mejor controlado con el uso de la profilaxis antiviral [2].

Es frecuente que las biopsias descubran una asociación

sincrónica o metacrónica de dos posibles etiologías de disfunción del injerto: **rechazo agudo (celular)** e infección activa por CMV [32,33]. El incremento de la inmunosupresión para el control del rechazo agudo podría ser responsable de la activación de la infección por CMV. Ello explicaría las virasis post-rechazo. No obstante puede constatare infección por CMV productora de disfunción sin rechazo agudo previo y sin inmunosupresión adicional a la basal. Es por ello que debe comentarse la posible relación entre infección por CMV y la alteración del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Se ha desarrollado una creciente evidencia de la influencia de la infección por CMV sobre la expresión celular de los antígenos de la clase I y II y por tanto podría sugerirse una inducción del RA por este virus [212]. Entre los 95 TxH estudiados, **siempre** que hubo detección de CMV en el injerto hepático se observó asociación estadísticamente significativa con uno o más episodios de rechazo agudo **previo** ($p < 0.01$). Por tanto en esta serie el inicio de los episodios de disfunción hepática por CMV debe relacionarse con el RA. La disfunción provocada por éste pudo ser muchas veces continuada por la complicación virásica. Sin embargo no hubo relación estadística entre el diagnóstico de hepatitis por CMV y la ocurrencia previa de otras frecuentes causas de disfunción del injerto como la patología biliar o la patología isquémica.

A pesar de todo lo anterior no parece claro que el rechazo agudo "per se" sea definitivamente el más importante factor de riesgo de infección y de hepatitis por CMV. El necesario

aumento de la inmunosupresión después de esta complicación (corticoides y/o el uso de fármacos citotóxicos y/o de globulinas anti-linfocitarias) parece ser el principal factor que mejor explica la relación entre RA y posterior desarrollo de infección y enfermedad por CMV [109,146]. Para aclarar si el responsable de gran parte de la incidencia de CMV era el RA o el uso de fármacos citotóxicos se aprovechó en este estudio la implantación de un nuevo protocolo que redujo muy sensiblemente el uso de anticuerpos monoclonales anti-OKT3. Después de la reducción de ese uso se observó una disminución significativa de la prevalencia de infección y de hepatitis por CMV (Tabla 11). Sin embargo, todavía permanece la duda de si algunas **características** del rechazo pueden favorecer el agravamiento de la infección por CMV. Los episodios de rechazo más graves (corticoresistentes) siguen siendo factores de riesgo de enfermedad por CMV [109].

En discordancia con lo informado por algunos autores [212] que consideran al **retrasplante** como un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad por CMV, en este estudio las porcentajes de hepatitis por CMV se mostraron más altos entre los pacientes con injertos primarios que entre los pacientes con segundos injertos (19,7% vs 10,5%).

III - HISTOPATOLOGIA:

III.A) Cuadro viral oportunista clásico:

En la literatura editada como libro existe la descripción de la afectación hepática por las virasis oportunistas (herpes virus, adenovirus, CMV, etc) como un cuadro histopatológico clásico [119,174,186,194,206]. Consiste en una distribución de focos inflamatorios y/o necróticos especialmente caracterizada por la ausencia de localización zonal: los focos inflamatorios se presentan irregularmente diseminados y sin preferencia por una área definida del lobulillo. Este dato microscópico común a varios virus no hepatotropos se complementa con otros caracteres morfológicos que ayudan a determinar, patognomonicamente o no, la etiología. Así, el herpes virus muestra focos con necrosis coagulativa, mientras que el CMV se asocia con anisocariosis y mitosis. La presencia de inclusiones celulares añade caracterización al cuadro microscópico y ello puede ser histologicamente definitivo (ej: polinucleación con inclusión del herpes, megalocitosis del CMV, esmerilización nuclear del adenovirus).

La relevancia que estos virus han tomado en la literatura de publicación periódica actual es debida al aumento de la prevalencia de la inmunodeficiencia adquirida espontanea (SIDA) o yatrogénica (inmunosupresión provocada para evitar el rechazo del injerto). Esta relevancia no se ha acompañado de valoraciones histopatológicas semiológicas. Es decir, el **complejo lesional** que el patólogo valora para hacer

diagnósticos microscópicos ha sido sustituido por "el dato": inclusión, positividad inmunohistoquímica, evidencia del agente infeccioso "in toto", etc. Así, en el tema del que se ocupa este trabajo, la literatura periódica expone la importancia de la histopatología en el diagnóstico de esta virasis [194], ello hasta el punto de considerar la inclusión, en preparación teñida con HE, como el "estandar" de comparación para evaluar la idoneidad de otras técnicas de demostración del CMV en tejido [54,150,160]. En la revisión de esta literatura no se ha encontrado una descripción global del cuadro histopatológico clásico por lo que la utilidad de su reconocimiento permanece minusvalorada.

Es oportuna en este momento una revisión del cuadro histológico **diagnóstico** de la hepatitis por CMV en orden a evaluar posteriormente la utilidad de ese complejo lesional microscópico sugestivo pero no concluyente.

En el presente estudio, el clásico cuadro histológico por CMV fue observado en las 23 biopsias con inclusiones. En concordancia con la literatura, hubo un mayor número de inclusiones en los hepatocitos (núcleo y citoplasma) que en los demás tipos celulares del hígado (endotelio, epitelio biliar) donde tales inclusiones también pueden ser detectadas [30,31, 111,194].

Los focos inflamatorios no fueron siempre iguales. Aquellos constituidos por una mezcla de linfocitos, macrófagos y leucocitos fueron los mas frecuentes, seguidos por los leucocitarios neutrofílicos puros. Estos últimos son altamente

peculiares ya que constituyen microabscesos que solo plantean diagnóstico diferencial con colangitis agudas [157]. Los granulomatosos (=células epitelioides) fueron excepcionales aunque su relación con CMV es indudable [14,107,165]. Aunque hubo biopsias con un tipo único de foco inflamatorio lo más frecuente fue una coexistencia de foco inflamatorio mixto con foco inflamatorio de célula única (neutrófilo).

Una valoración de la anisocariosis, la anisocitosis, el hipercromatismo y las mitosis parece útil al enfrentarse con una biopsia de tejido hepático ya que estuvieron presentes en al rededor del 50% de los casos estudiados (Tabla 12).

La relación topografica entre inclusión y foco inflamatorio fue variada creando una incógnita patogénica de esta inflamación en cuanto al por qué de la presencia de infiltrados sin evidencia de inclusión cercana (sin material viral) y al por qué de inclusiones no rodeadas por reacción inflamatoria (vide infra).

III.B) Cuadro "sugestivo de hepatitis por CMV":

La recogida de biopsias con un cuadro "sugestivo de hepatitis por CMV" que ofrece este trabajo ha puesto de manifesto como **dato positivo** que un 23,5% de los mismos (36,4% de los injertos de los que provenían) fueron definitivamente confirmados como causados por CMV por las técnicas especiales, específicas por demostrar antígenos o genomas virales.

Como **datos negativos a favor** de la etiología CMV de este

cuadro están también: 1) la ausencia de diferencias significativas entre las incidencias de los caracteres morfológicos (poblaciones inflamatorias de los focos, distribución de los mismos, etc.) de las biopsias sugestivas y de las diagnósticas, y 2) la ausencia de diferencias significativas entre los tipos de diagnósticos asociados en las disfunciones plurietiológicas (Tabla 15).

En orden a apoyar al CMV como posibilidad etiológica son oportunos los análisis de los siguientes datos circunstanciales: 1º) el tiempo postTxH en que las biopsias sugestivas se diagnosticaron de tal cuadro, 2º) la existencia de hepatitis por CMV confirmada en algun otro momento del curso clínico de esos pacientes y 3º) la sensibilidad de los anticuerpos utilizados en la detección de los distintos productos de CMV:

1º) El **tiempo post-TxH** en el que se observó el cuadro sugestivo es significativamente más prolongado que el tiempo en el que se observó el cuadro diagnóstico con inclusiones. Este hecho exige un análisis detallado de los casos sugestivos que fueron posteriormente confirmados y de los casos sugestivos que no llegaron a una confirmación definitiva. Las diferencias significativas entre los tiempos medios (momento en que se diagnosticó "inclusión" enfrentado a momento en que se diagnosticó "sugestivo") suceden por la existencia de "outliers" entre los sugestivos pero que se confirman con técnicas específicas (Tabla 22, caso 30 y caso 12). Retirados de la prueba

estadística los casos confirmados se observa que los que no alcanzan confirmación (26 biopsias) sí suceden en el tiempo medio postTxH (61 ± 43 días) de los definitivos. Además esta ausencia de positividad no descarta que el virus o sus antígenos estén en cantidad insuficiente para alcanzar el nivel de sensibilidad de estas técnicas.

2°) Diez (50%) de los 20 pacientes portadores de la biopsia "sugestiva de infección por CMV" sufrieron esta hepatitis confirmada 17 ± 12 días antes o después de la observación del cuadro sugestivo.

3°) El antisuero utilizado teóricamente detecta antígenos tempranos y tardíos del CMV con la misma sensibilidad (información de la casa comercial). El hallazgo de que solo se confirmaron cuadros histológicos "sugestivos" de CMV en pacientes en las que ya se había detectado CMV en biopsias previas (Tabla 22) condujo a testar los anticuerpos "detectores". Se infectaron cultivos celulares de fibroblastos intencionadamente. Se comprobó que en las primeras 24 horas después de infectar dichos cultivos existió positividad pero de intensidad mucho más débil que la objetivada 48 horas después con el mismo antisuero (FIG.23). Esta menor sensibilidad para antígenos tempranos del CMV podría explicar que aquellas infecciones iniciales del hepatocito injertado produjeran alteración morfológica (atracción de leucocitos) y, sin embargo, no fueran detectadas por IHQ. En la Tabla 23 se observa que 7 de 11 biopsias "sugestivas" no confirmadas corresponden a

pacientes que días **más tarde** desarrollan la hepatitis por CMV.

Los anteriores datos y comentarios suscitan aquí una consideración de la **patocronia** de las lesiones morfológicas microscópicas:

- La mayoría de los casos "sugestivos" que se confirmaron correspondieron a pacientes que ANTES (biopsias más anteriores) mostraron claras inclusiones y la mayoría de aquellos no confirmados desarrollaron MAS TARDE el cuadro diagnóstico. Con estos datos puede interpretarse que el cuadro histológico **sin** inclusión es en la mayoría de los casos indicativo de **a)** escasos antígenos o genomas virales y **b)** momento PREVIO o POSTERIOR a la fase de estado de la infección activa en el hígado.

III.C) Evaluación comparativa de las técnicas de demostración tisular del CMV:

Por ser la hepatitis por CMV una frecuente causa de disfunción del injerto postTxH es importante la valoración de nuevas técnicas diagnósticas de detección de CMV en biopsia hepática. Su utilidad es favorecer el diagnóstico y el diagnóstico diferencial con otras síndromes postTxH y la adecuación terapéutica del paciente trasplantado.

Entre las 70 biopsias hepáticas seleccionas por criterios preestablecidos (vide material y métodos) en el presente

estudio, 35 biopsias correspondientes a 27 pacientes fueron diagnosticadas de hepatitis por CMV por uno o más de los tres métodos utilizados en este material (HE, IHQ e HIS). No todos estos métodos ofrecieron el mismo rendimiento. La IHQ diagnosticó mayor número de casos y biopsias ($s=0,83$), seguida de la demostración de inclusión en HE ($s=0,66$) y, a importante distancia, de la HIS ($s=0,49$).

En concordancia con otros autores [39,72,135,150,168], nuestros resultados mostraron que la IHQ es el método más sensible ($s=0,83$) para el diagnóstico del CMV (Tabla 16). Su buena sensibilidad se debe, como se hace obvio al ver los resultados, a que demuestra células positivas con morfología normal. El hecho de que la IHQ sea el principal responsable de la confirmación viral en los especímenes con el cuadro histológico "sugestivo de hepatitis por CMV", refrenda tan alta sensibilidad (Tabla 22). Otro aspecto importante es que nuestra muestra, al contrario de la mayoría de las publicadas en la literatura, fue obtenida de una serie donde la IHQ se realizó rutinariamente en todos los especímenes. Como consecuencia de esta rutina, en algunos casos (4 biopsias) sin inclusión y sin cuadro "sugestivo" la IHQ resultó positiva. Tal hecho valora más aún la sensibilidad de la IHQ ante las demás técnicas.

La detección de la inclusión típica de CMV por HE se mostró también muy sensible aunque algo menos que la IHQ ($s=0,66$ vs $s=0,83$). A pesar de ello 4 biopsias que habían mostrado inclusión por estudio HE resultaron negativas en IHQ debido a que esa u otra inclusión no estuvo presente en el

único corte dedicado al estudio inmunohistoquímico en el que tampoco se objetivó otra positividad celular. Estos casos demuestran como la histología con HE puede detectar CMV con una sola inclusión entre los múltiples cortes disponibles (varios por preparación), alcanzar también un buen rendimiento y solucionar algunos casos que la IHQ o la HIS no han resuelto. Las técnicas especiales para CMV (IHQ e HIS) se realizan en solo uno o dos cortes por motivos técnicos y económicos, por lo que la posible escasez de células positivas puede llevar a falsos negativos.

La HIS no fue un método tan sensible ($s=0,49$) habiendo diagnosticado tan solo 17 de las 35 biopsias positivas (Tabla 16). Además, entre los 8 casos de cuadros "sugestivos" confirmados, la HIS detectó CMV en tan solo dos (Tabla 22). La baja sensibilidad de la HIS en el injerto hepático cuando es comparada con la detección de antígenos virales (IHQ) o de inclusiones CMV (HE) ha sido reportada frecuentemente [150,160,168]. La HIS puede detectar células morfológicamente normales [54,150] pero esta detección fue significativamente más frecuente con la técnica de IHQ debido a la demostración de antígenos tempranos (Tabla 19). La HIS parece necesitar de una mayor cantidad de elementos virales para resultar positiva [213].

En discordancia con algunos autores [39,150,160,218], en nuestros resultados el tiempo medio de diagnóstico de la IHQ fue más tardío cuando fue comparado con el de las otras dos técnicas (HIS y HE) (Tabla 21). Tal hecho ha sido ya comentado

en el apartado anterior (III.b) de esta misma discusión. Cabe citar la importancia en la elección de un suero testador con anticuerpo temprano para IHQ que ofrezca la ventaja de un diagnóstico precoz y permita el inicio del tratamiento específico y temprano de la infección [197,217].

Con la presente experiencia puede decirse que la conducta más optima para obtener el máximo número de diagnósticos sería que se estudiasen morfológicamente (HE) multiples secciones y que se aplicasen las técnicas especiales en todas las biopsias hepáticas en TxH para revelar el máximo número de infecciones hepáticas por CMV. Esta conclusión es deducible de la evidencia la de complementariedad entre todas las técnicas que anteriormente se ha expuesto. Sin embargo la limitación impuesta por el precio de tales exploraciones imposibilita este comportamiento idoneo ante cada biopsia en TxH. Una recomendación plausible sería estudiar el máximo número de cortes teñidos con HE a la búsqueda de inclusiones, especialmente en aquellas biopsias realizadas en el periodo postrasplante de mayor prevalencia del CMV (20-60 días). Puede ser excesivo aplicar HIS e IHQ a todas estas biopsias pero ambas técnicas deben considerarse imprescindibles cuando el cuadro histológico sea "sugestivo de hepatitis por CMV" (sin inclusiones) para aumentar al menos en 1/4 los diagnósticos concluyentes.

III.D) Revisión de los criterios de Infección y de Enfermedad por CMV en tejido hepático:

Trás el contacto inicial con el virus, este no desaparece del organismo y la positividad sérica de sus anticuerpos define una infección latente que persiste probablemente durante toda la vida. Las células identificadas como las que albergan el virus en situación latente han sido las hemáticas (linfocitos, monócitos y polimorfonucleares) [121]. No se ha descartado que otras células en otros tejidos (cerebro, riñon, bazo, pulmon e hígado) puedan desempeñar también este papel [121,218].

La biopsia hepática positiva (=inclusión y/o IHQ+ y/o HIS+) demuestra infección activa del injerto en el seno de la infección sistémica. No obstante el cuadro histológico acompañante no es siempre el mismo. Carecemos de explicación para los cuadros que provocan inclusiones virales o positividad por técnicas especiales (IHQ y/o HIS) sin reacción inflamatoria celular acompañante. Tampoco conocemos los factores que determinan que el número de células infectadas por unidad de volumen tisular sea muy variable.

Ante tales hechos se puede considerar que existen las **situaciones tisulares hepáticas** siguientes:

a) Citomegalovirus (por HE, IHQ o HIS) con lesión tisular: es el **"cuadro clásico"** que constituye la más definitiva expresión de la **enfermedad hepática por CMV**.

b) Enfermedad-Hepatitis sin demostración del virus o sus productos (no inclusión, no antígenos, no DNA) como en el cuadro **"sugestivo de hepatitis por CMV"** que no se consigue confirmar por IHQ o HIS. Tal situación podría ser debida a otro virus oportunista pero parece más probablemente debida a una insuficiente sensibilidad de estas técnicas para su demostración.

c) Infección activa hepática sin enfermedad: Citomegalovirus (demostrado por inclusión, o antígenos, o genoma en hepatocito positivo) sin inflamación tisular acompañante. Esta situación de persistencia intracelular del virus, sin reacción inflamatoria inmune (posiblemente por no presentar antígenos virales desde la célula al intersticio) sería similar a la llamada hasta ahora latencia. El virus no lisa la célula y se reproduce en ella de forma, temporalmente al menos, simbiótica. En estos casos el CMV parece no comportarse como citopático sino más bien como virus latente sugiriendo que solo cuando asocia una respuesta inmune se produce la lesión. Así pues: la inmunocompetencia mantendría el virus escasamente replicante e intracelular, 2) la inmunosupresión basal para mantener el injerto hepático provocaría su replicación y contagio a otras células y 3) una ocasional respuesta inmune (a pesar de la inmunosupresión basal y sobre todo después de suprimir la adicional que se emplea para controlar el RA) sería la desencadenante final de la lesión.

Esta interpretación y curso patogénico lleva a revisar el **criterio diagnóstico de hepatitis por CMV**. Para diagnosticar esta enfermedad no basta con demostrar el virus en tejido hepático por cualquier técnica, es necesario además evidenciar lesión tisular concomitante. El diagnóstico definitivo de hepatitis por CMV debería incluir la evidencia del cuadro histológico aquí denominado "cuadro clásico" elevando el mínimo de los criterios hasta ahora admitidos (demostración del virus en tejido hepático por HE, IHQ o HIS). En este sentido viene demostrándose muy recientemente que otras sensibles técnicas de biología molecular (PCR en tejido) detectan CMV en tejidos sin lesión de pacientes sin enfermedad ni alteración funcional del órgano o del sistema [40].

Con la patocronia descrita es posible el cambio entre las situaciones anteriores. El factor TIEMPO DE EVOLUCION combinado con la variación en la INMUNOCOMPETENCIA provocan que pueda verse en el mismo paciente y en el mismo injerto una evolución desde una situación de "relación simbiótica" entre hepatocito y virus a una situación de "relación lesiva" y viceversa. Además, no necesariamente tales situaciones son sucesivas cuando nos referimos a elementos celulares individuales puesto que pueden demostrarse coexistentes. Así se han evidenciado hepatocitos portadores del virus sin reacción inflamatoria a su alrededor y hepatocitos sin inclusión rodeados por células inflamatorias en el mismo tejido biopsico.

Estos posibles cursos desde la presencia viral intensa sin inflamación hasta la inflamación focal intensamente diseminada

sin detección de virus (escasa sensibilidad de las técnicas o escasa presencia del virus) explican también que injertos que muestran hepatitis por CMV presenten biopsias anteriores o posteriores con "tan solo" cuadro lesional sugestivo de presencia viral (=escasos productos virales y relevante respuesta inflamatoria).

III.E) Evolución de la Hepatitis por CMV:

Entre nuestros pacientes no se observó ningún exitus ni ninguna pérdida del injerto atribuible a la infección hepática por CMV. Si bien la infección generalizada por CMV y el ataque a otros órganos (ej:pulmón) son capaces de producir mortalidad [162], la literatura también coincide en la escasez de pérdidas de injerto hepático o de muertes por hepatitis CMV [109]. La supervivencia actuarial al año de nuestros 27 pacientes fue algo más alta que la global de la serie completa de TxH en el Programa del Hospital 12 de Octubre, pero no hubo diferencia estadísticamente significativa. Entre ellos se apreció mayor morbilidad ya que el número de retrasplantes (9/27 casos = 33%) fue superior al esperado en la serie global (tasa de retrasplante= 18%). No obstante, es posible que las pérdidas del injerto hayan estado condicionadas más por los factores facilitadores de la infección hepática por CMV (rechazo agudo como factor de riesgo) que por la hepatitis por él producida. La infección hepática por CMV en el contexto del rechazo intensamente tratado puede ser más un epifenómeno que un

desencadenante de la pérdida del injerto o del paciente.

En este apartado de la discusión es preciso comentar la posible relación entre la infección por CMV del injerto y el desarrollo posterior de rechazo crónico. En esta serie ha resultado estadísticamente significativa la asociación entre hepatitis por CMV y el posterior desarrollo de rechazo crónico. La sugerencia de que la infección hepática por CMV puede ser un factor facilitador o colaborador en el desarrollo de rechazo crónico [6,44,58,59,94,138,227] está basada en una asociación estadísticamente significativa de esta infección y el rechazo crónico como la observada en esta serie. Sin embargo, no todos los grupos que han estudiado estas dos patologías han obtenido similares resultados [146,150,238].

En los más recientes artículos la asociación no fortuita entre hepatitis por CMV y rechazo crónico se defiende como posible entre aquellos casos en los que el trasplante se da en un contexto de identidad **parcial** entre el HLA del donante y el HLA del receptor. Este tipo de identidad parcial sería: identidad en el HLA de clase I (A,B,C) y ausencia de identidad en el HLA de clase II (HLA-DR). La infección por virus facilita la expresión de los antígenos del HLA en las células infectadas como un mecanismo orientado al reconocimiento del agente intracelular y consecuentemente estas células son transformadas en diana del ataque inmune. El CMH (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) pone en marcha ese ataque inmune contra la infección vírica al presentar los antígenos virales junto con los antígenos del HLA en la membrana de las células

infectadas segun las teorías propuestas [238], cuando existe una identidad del HLA entre linfocitos y células infectadas por virus, la capacidad de los primeros para destruir a las segundas es completa (consecuente desaparición del virus). Cuando la identidad es parcial la capacidad linfocitaria de destrucción de las células diana (infectadas) está disminuida. Este último hecho facilita la persistencia del virus y, además, mantiene un ataque inmune continuo no totalmente eficaz [238].

En el caso de la infección del injerto hepático por CMV la identidad parcial del HLA entre donante y receptor facilitaría el ataque continuo y la destrucción progresiva de sus células. El epitelio biliar expresa persistente e intensamente antígenos del HLA [6], la infección por CMV facilitaría que fuera la diana permanente del ataque inmune condicionando la pérdida progresiva de ductos. La pérdida progresiva de ductos es la característica morfológica típica del rechazo crónico [234].

La permanencia de la hepatitis por CMV no fue larga en nuestros casos. El caso de máximo tiempo comprobado fue de 33 días y tal caso no evolucionó a rechazo crónico. Sin embargo, el único caso en el que recidivó la infección hepática por CMV (con ausencia de CMV en tejido durante un periodo intermedio de 333 días entre dos episodios de hepatitis) evolucionó al rechazo crónico tras nuevos episodios de rechazo agudo. Es obvio que todavía no se pueda descartar la permanencia en el tejido hepático de escasos viriones, insuficientes en número para producir hepatitis clínica o morfológica y para alcanzar

la sensibilidad de las técnicas hasta ahora empleadas. La confirmación de algunas de estas hipótesis precisa continuar los estudios con los nuevos avances de la biología molecular, utilizados en colaboración con la histopatología. La reacción en cadena de la polimerasa, empleada en el corte histológico de tejido hepático (PCR in situ), parece ser un método adecuado para alcanzar nuevos objetivos.

CONCLUSIONES

- 1) En la presente serie de 82 (100%) pacientes con 95 trasplantes hepáticos la incidencia de **infección activa por CMV** fue del 59,8% y de **hepatitis** del 19,5%. La hepatitis se presentó en el día 48±22 postcirugía (23-114 días).
- 2) Los pacientes con **más riesgo** de padecer hepatitis por CMV fueron aquellos con alguna de las siguientes características: **hepatitis fulminante** en su hígado nativo, combinación de serología antiCMV **donante+/receptor-**, episodios de **rechazo agudo** y uso de **anticuerpos monoclonales anti-OKT3**.
- 3) La hepatitis por CMV **histológicamente** se caracterizó por **inclusiones** nucleares y/o citoplasmáticas hepatocitarias (100%) y por **focos inflamatorios diseminados** (91,3%) (mixtos y/o leucocitarios y/o granulomatosos) en un transfondo de **anisocariosis** e **hipercromatismo** hepatocitarios.
- 4) La **comparación** de la utilidad de los **marcadores tisulares** usados como medio diagnóstico de la hepatitis por CMV evidenció que la inmunohistoquímica fue la técnica con más sensibilidad ($s=0,83$). Fue seguida en rendimiento por la evidencia de inclusiones solo con HE ($s=0,66$) y por la demostración de DNA viral con hibridación in situ ($s=0,49$).
- 5) Un cuadro histológico de **hepatitis focal diseminada sin evidencia de inclusiones** es muy sugestivo de infección por CMV: Entre 34 biopsias con este cuadro 8 (23,5%) resultaron positivas con IHQ y/o HIS. Ello hizo observar hepatocitos colonizados por CMV (+ en IHQ y/o HIS) sin alteración morfológica en HE.

- 6) Consecuencia de lo anterior es que el estudio HE de las biopsias del injerto hepático que no muestran inclusiones debe complementarse con técnicas de IHQ e HIS en: 1) el período medio postTXH de mayor incidencia de esta patología y 2) siempre que aparezca una hepatitis focal diseminada como la aquí descrita.
- 7) En la **evolución** de la hepatitis por CMV:
- a) Se comprobó una **duración** máxima de 33 días, con **remisión** en todos los casos y con **recidiva** en una sola ocasión.
 - b) La **morbilidad** fue más alta entre los pacientes que sufrieron hepatitis por CMV que entre los que no la padecieron (34% vs 18%). La **supervivencia** actuarial al año de seguimiento fue algo mayor pero no estadísticamente significativa al ser comparada con una muestra de 100 pacientes trasplantados hepáticos consecutivos.
 - c) Se observó una **asociación** ($p=0,04$) entre la infección del injerto por CMV y una posterior evolución a **rechazo crónico ductopénico**

En resumen, en el curso de los tres primeros meses postrasplante hepático el 60% de los pacientes presentará infección activa por citomegalovirus (19,5% hepáticas). Además de las descripciones clásicas morfológicas de la hepatitis por CMV, ya referidas en la literatura, también se pueden observar hepatitis focales diseminadas sin inclusiones virales que se confirman con técnicas especiales (IHQ e HIS). Las hepatitis por CMV no incrementan la mortalidad, pero resulta una asociación estadísticamente significativa con la aparición posterior de rechazo crónico.

FIGURAS

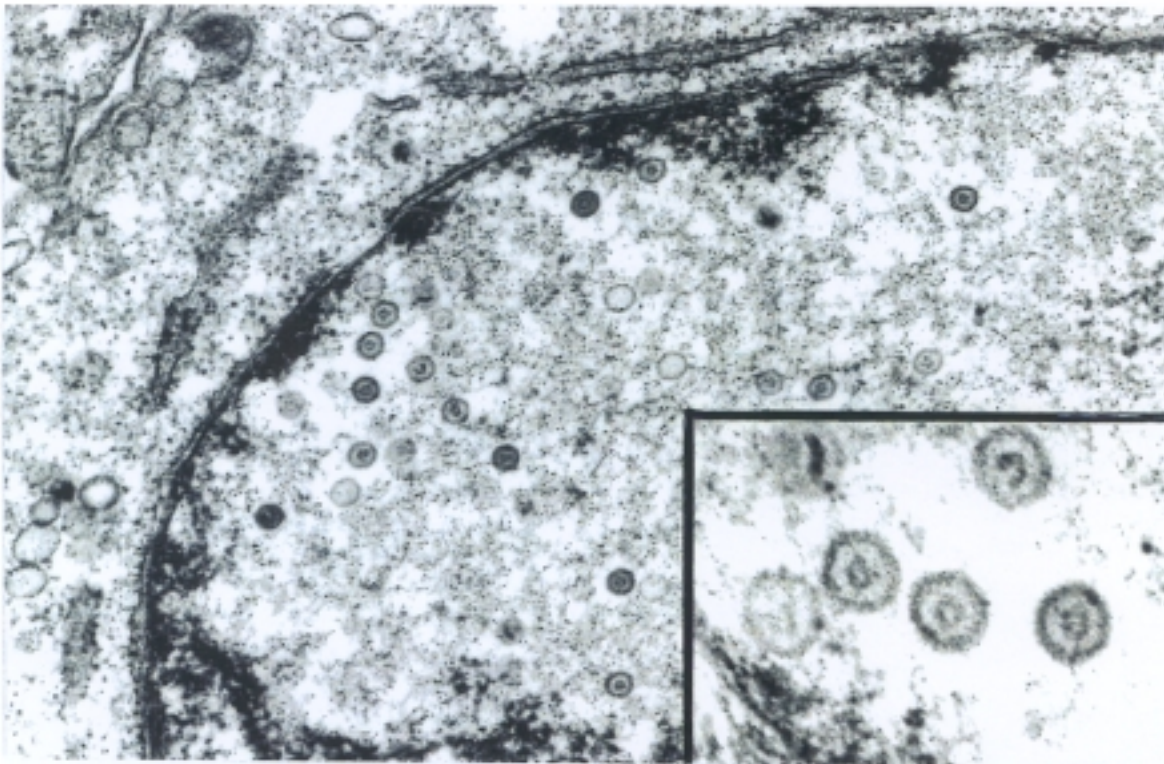


FIGURA 1. (ME X 38.000) Detalle nuclear con abundante virus poliedricos del grupo herpes. En el angulo inferior derecho se observa la forma poliedrica de la capsida (ME X 105.000).

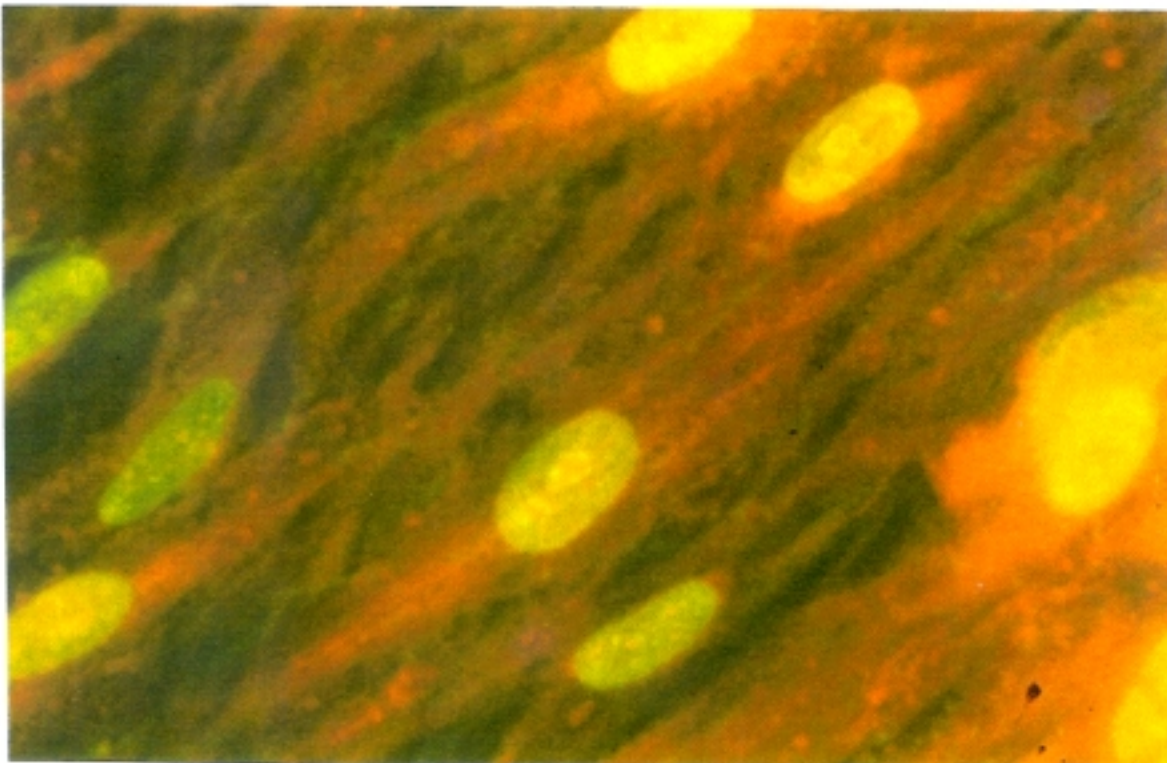


FIGURA 2. Inmunotincion de fibroblastos humanos infectados utilizando anticuerpo monoclonal conjugado con fluoresceína.

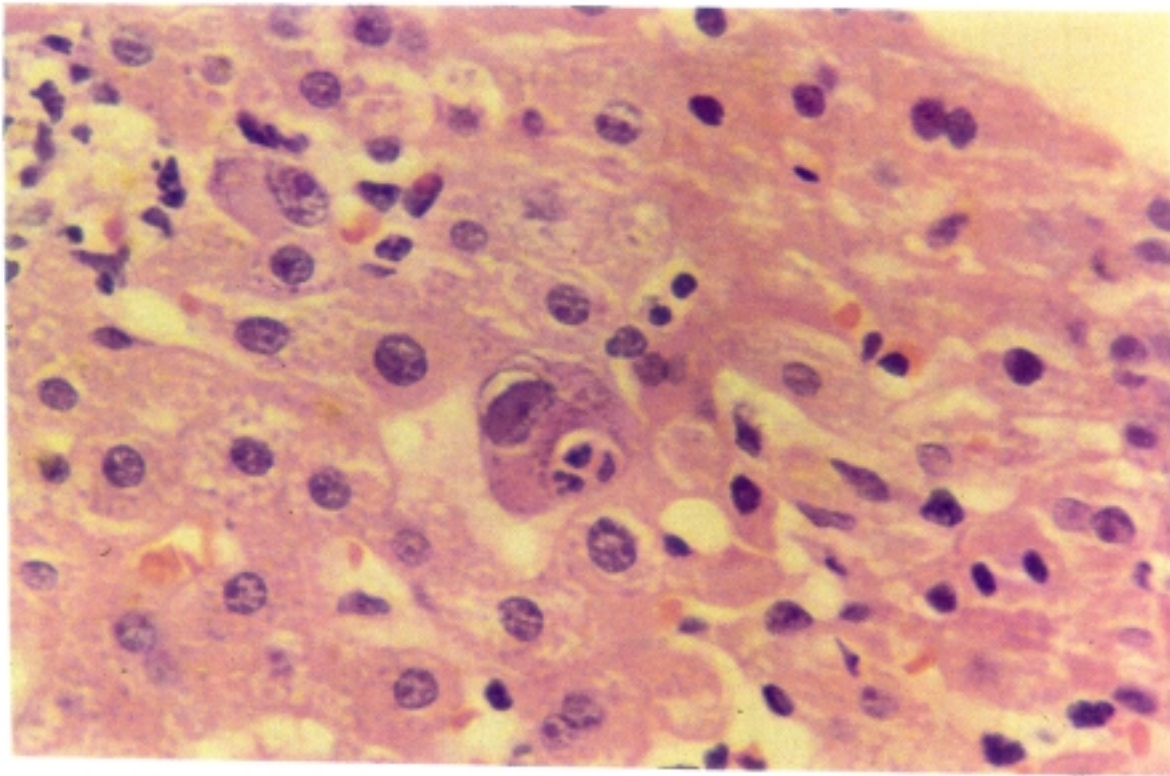


FIGURA 3. Hepatocito infectado con inclusión nuclear característica (HE).

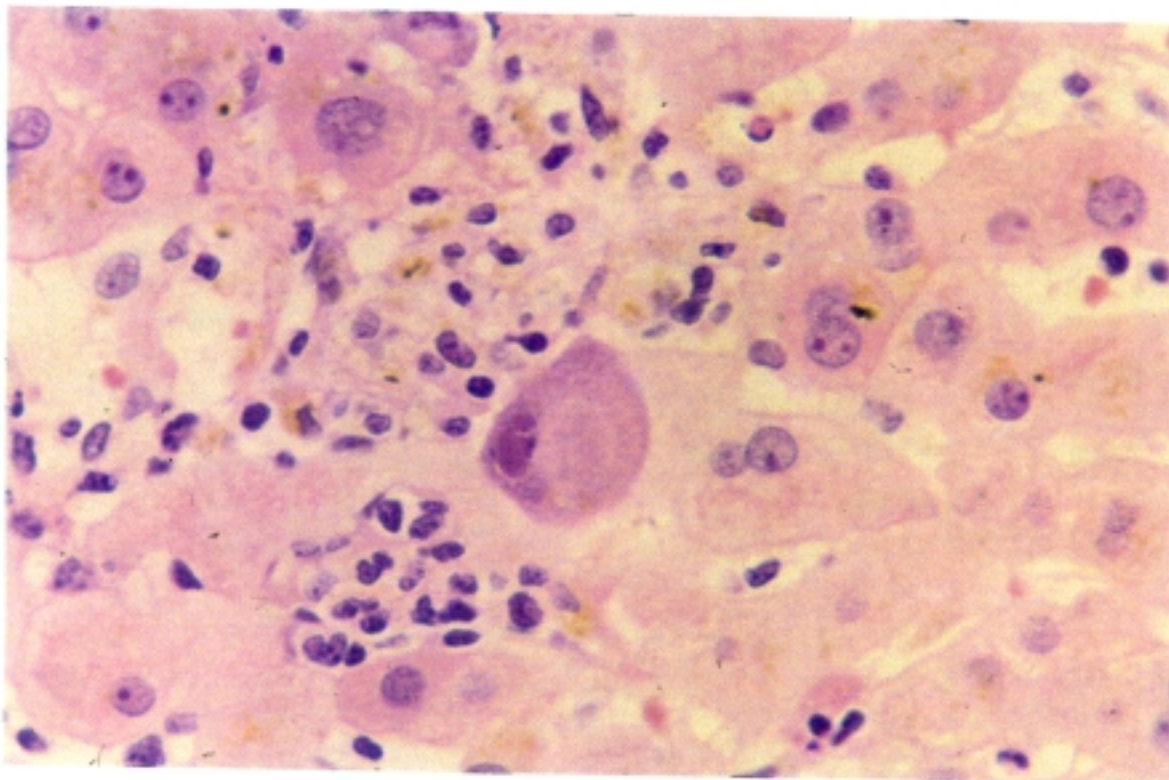


FIGURA 4. Hepatocito citomegálico con inclusión citoplasmática característica (HE).

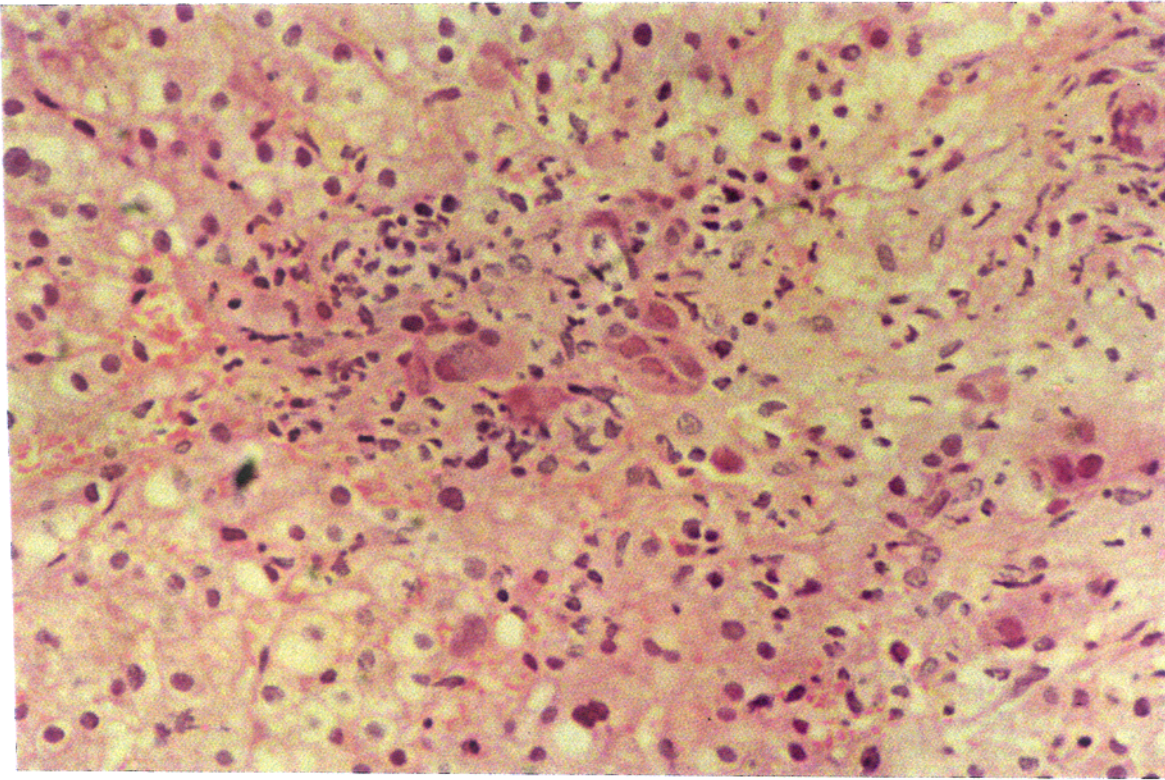


FIGURA 5. Inclusiones virales en epitelio de ductos biliares rodeados por infiltrado inflamatorio mixto (HE).

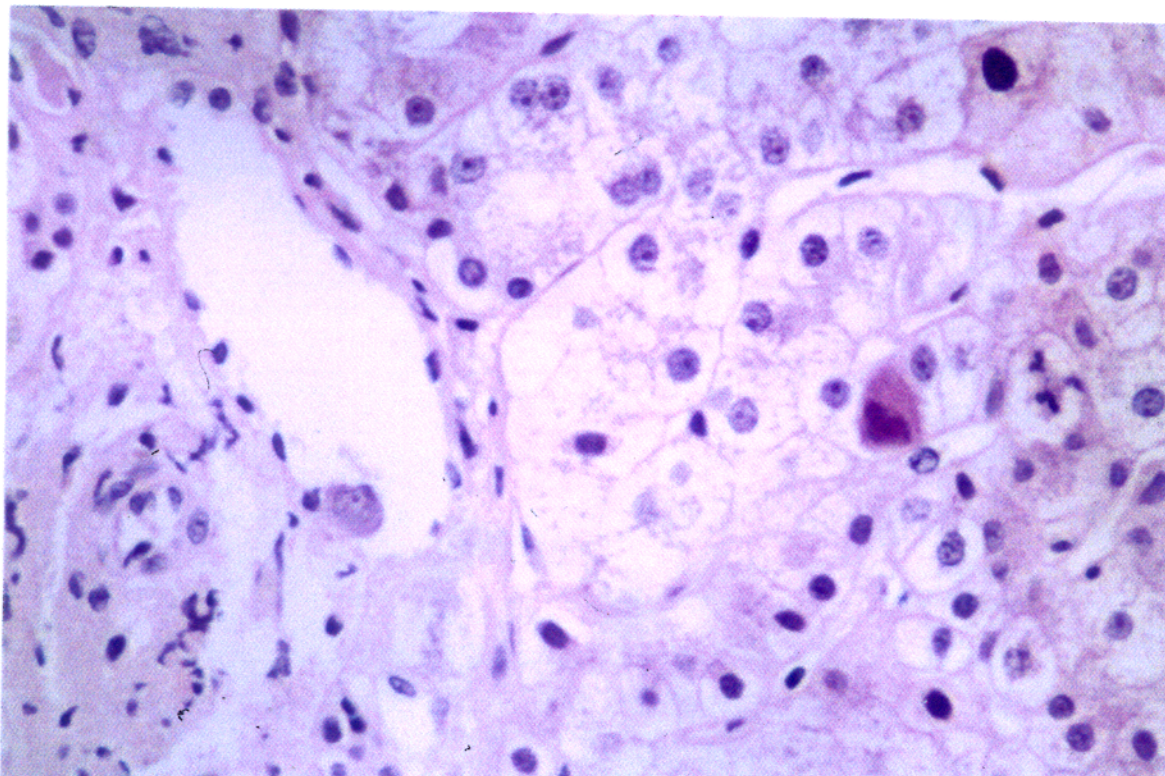


FIGURA 6. Inclusiones virales en endotelio y en hepatocitos sin reacción inflamatoria (HE).

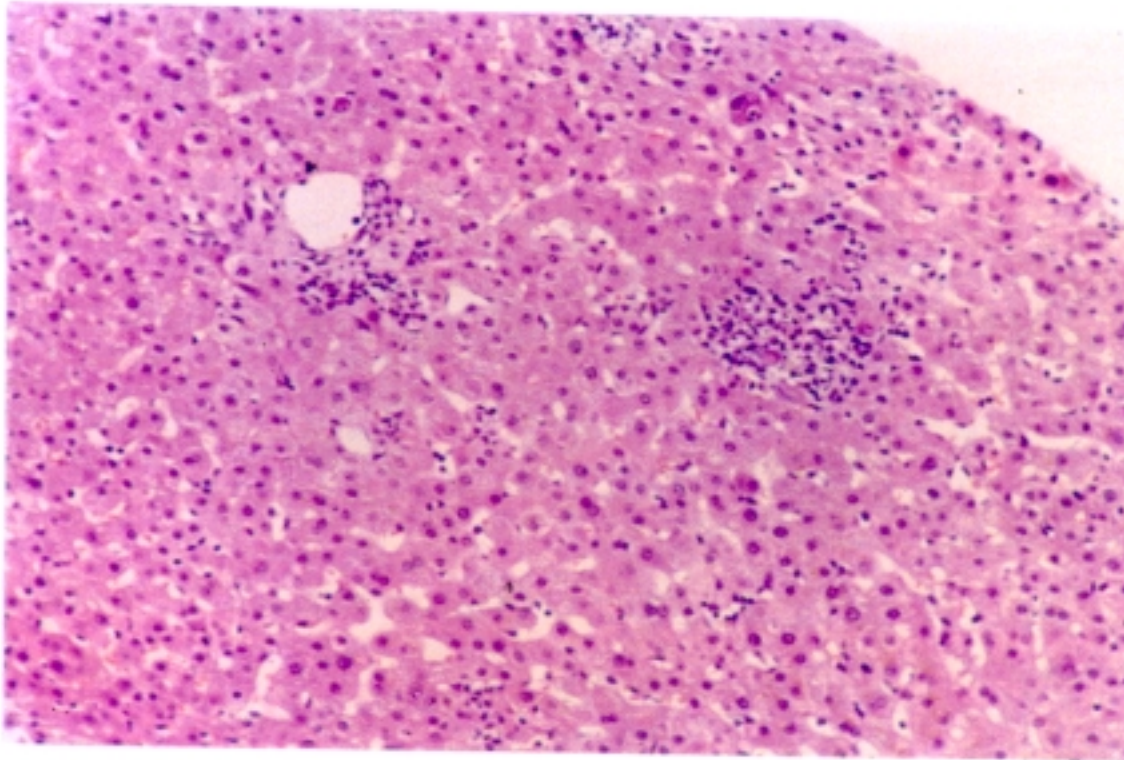


FIGURA 7. Focos inflamatorios diseminados y presencia de hepatocitos citomegálicos con inclusiones características (HE).

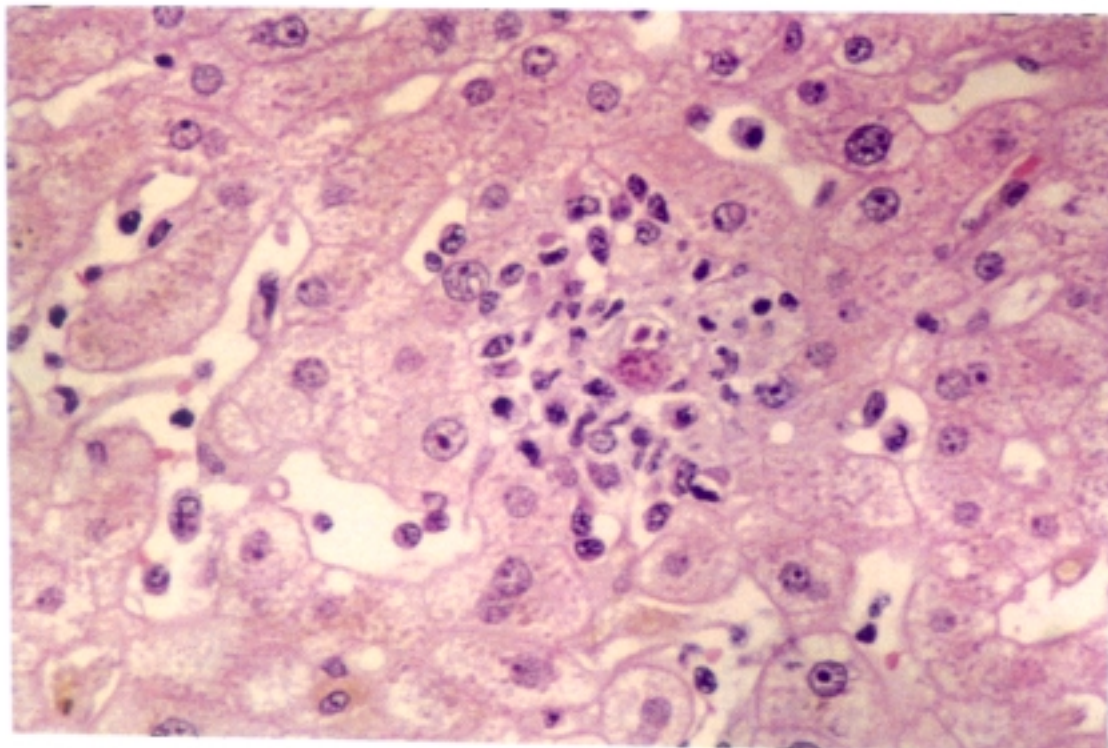


FIGURA 8. Hepatocito infectado con inclusiones nucleares y citoplasmática circundado por infiltrado focal mixto (HE).

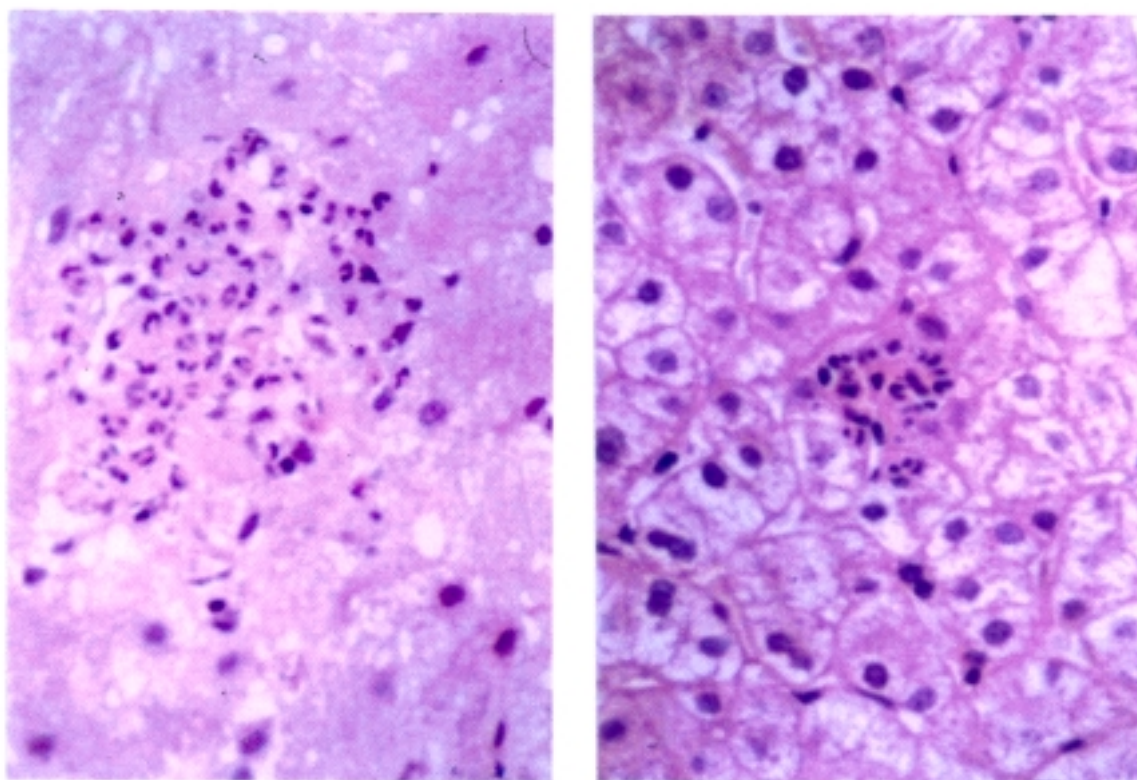


FIGURA 9. A,B) Focos inflamatorios neutrofílicos puros (HE).

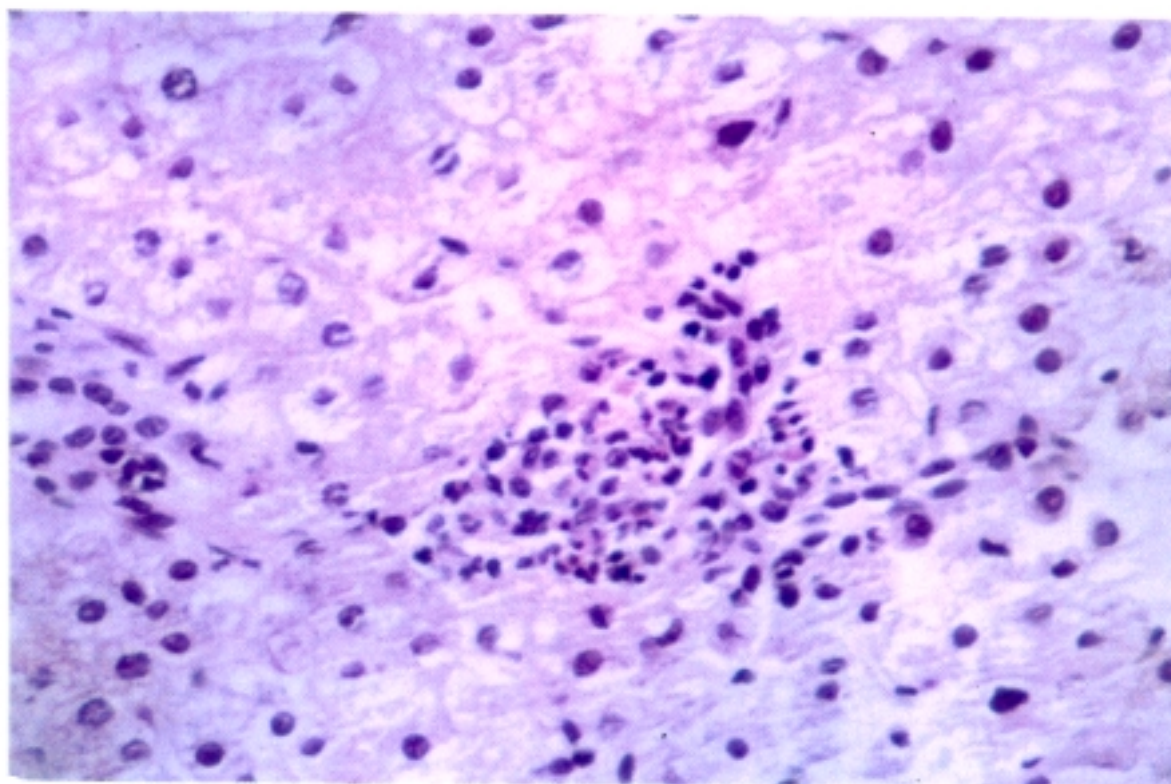


FIGURA 10. Foco inflamatorio mixto con predominio leucocitario (HE).

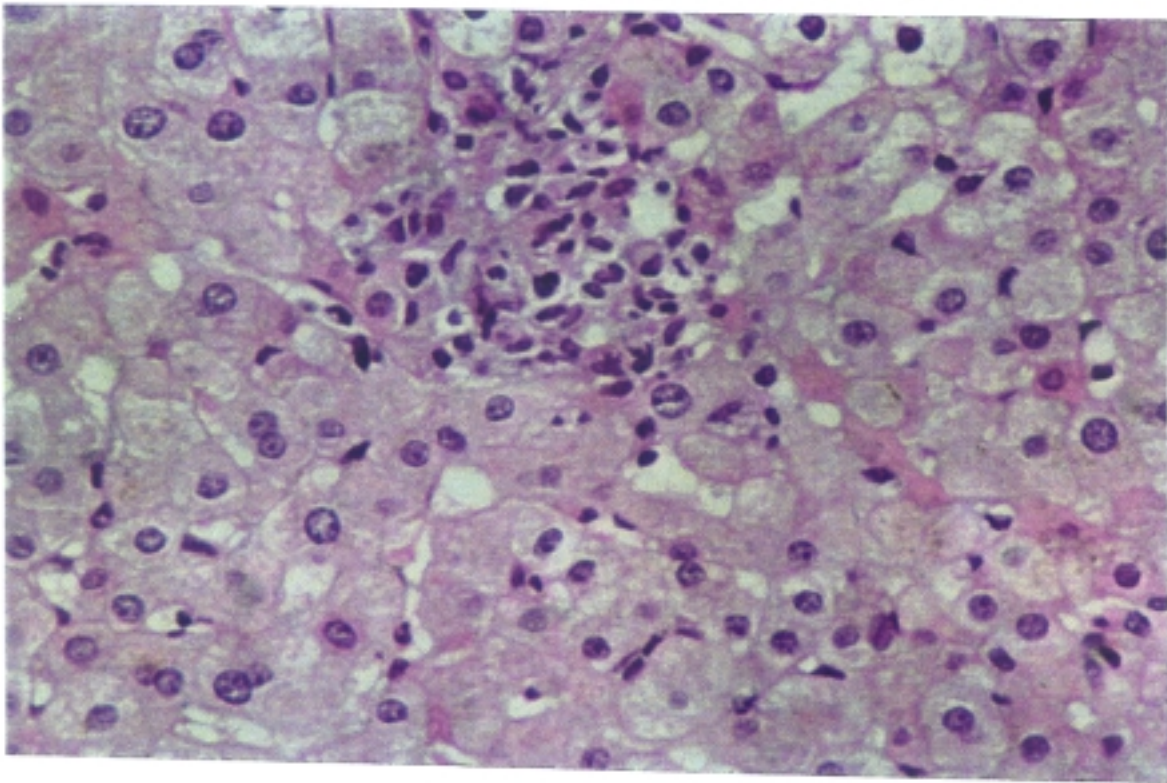


FIGURA 11. Foco inflamatorio mixto (HE).

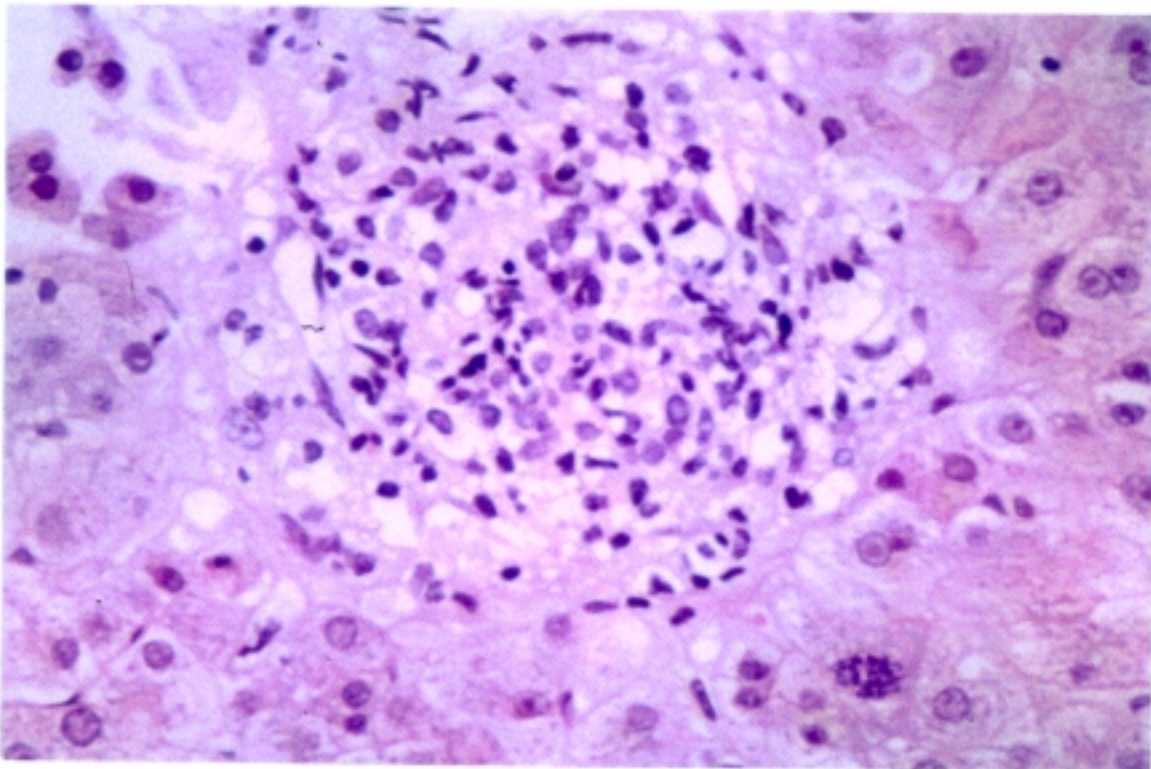


FIGURA 12. Foco inflamatorio mixto con predominio de células redondas (HE).

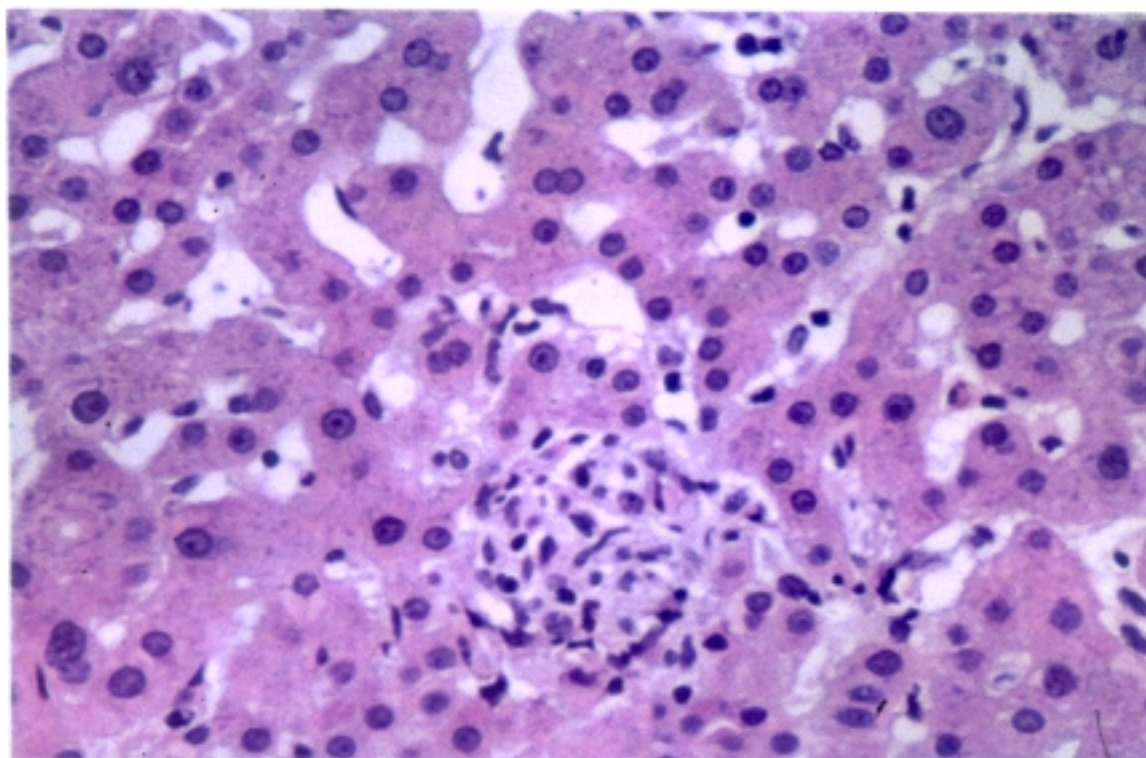


FIGURA 13. Foco inflamatorio granulomatoso (HE).

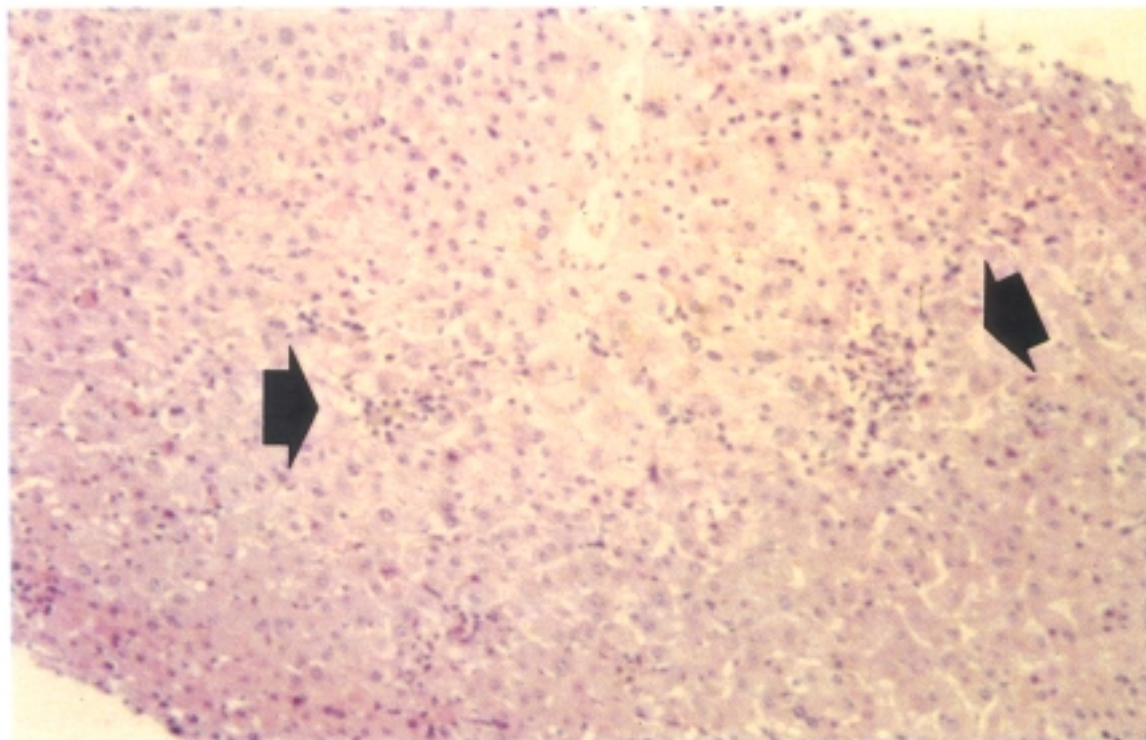


FIGURA 14. Focos inflamatorios diseminados sin detección de inclusiones citomegálicas (HE).

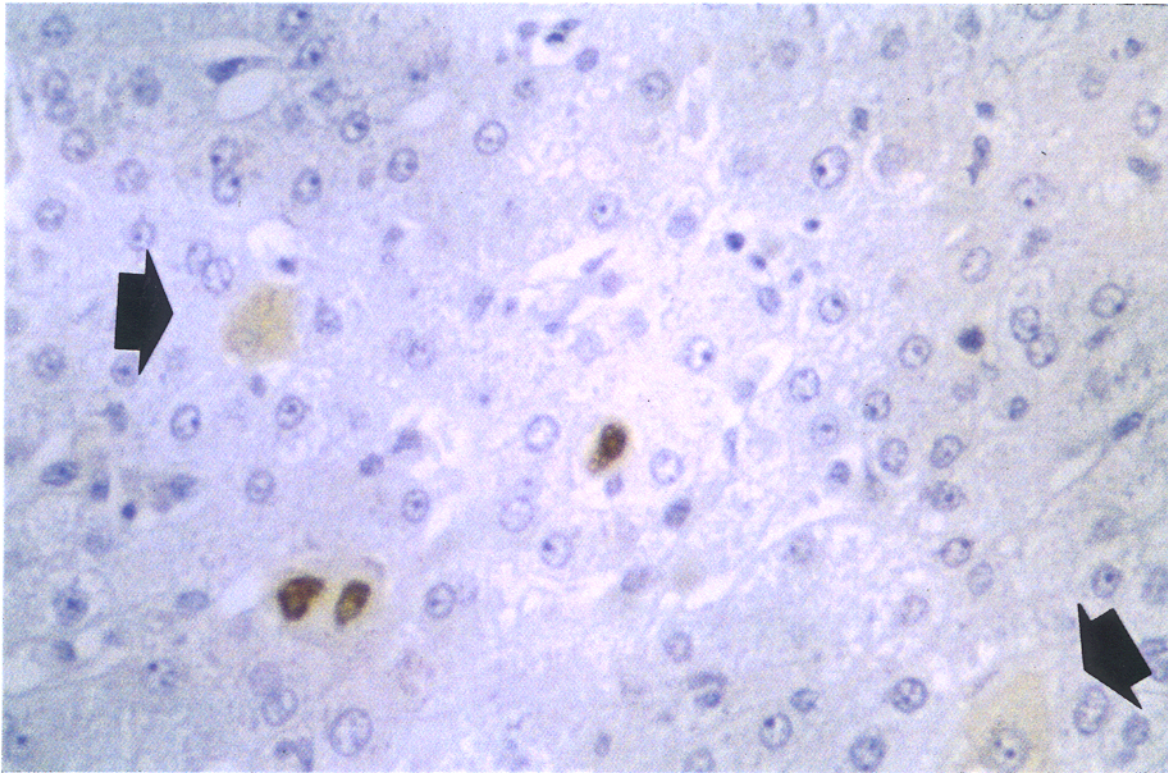


FIGURA 15. Inmunohistoquímica- Positividad celular en nucleo y citoplasma.

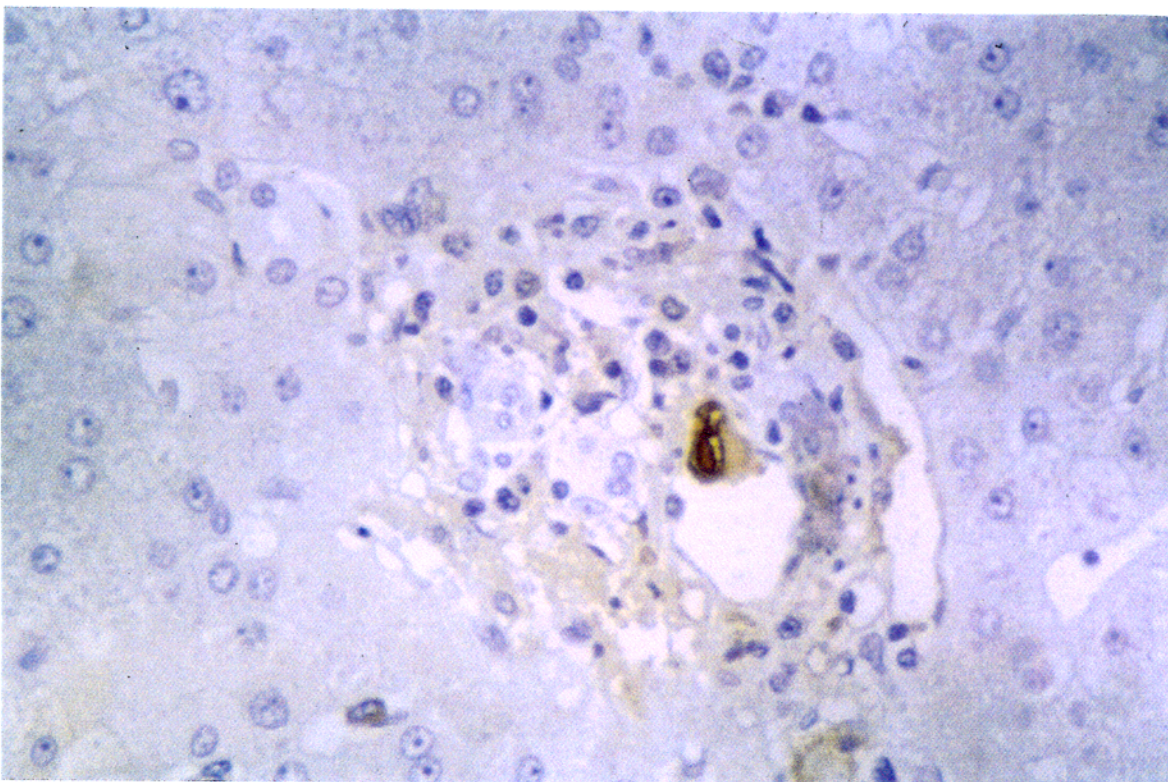


FIGURA 16. Inmunohistoquímica- Positividad celular en célula endotelial.

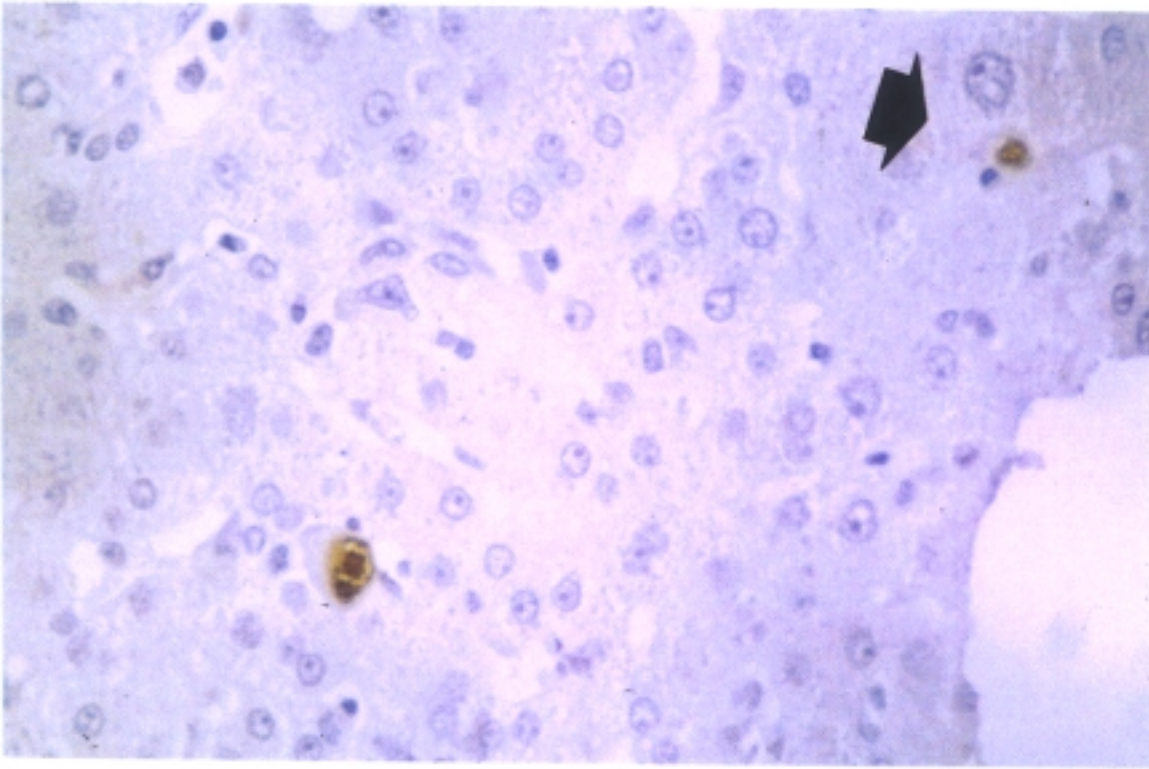


FIGURA 17. Inmunohistoquímica- Positividad de hepatocitos citomegálicos y de morfología normal.

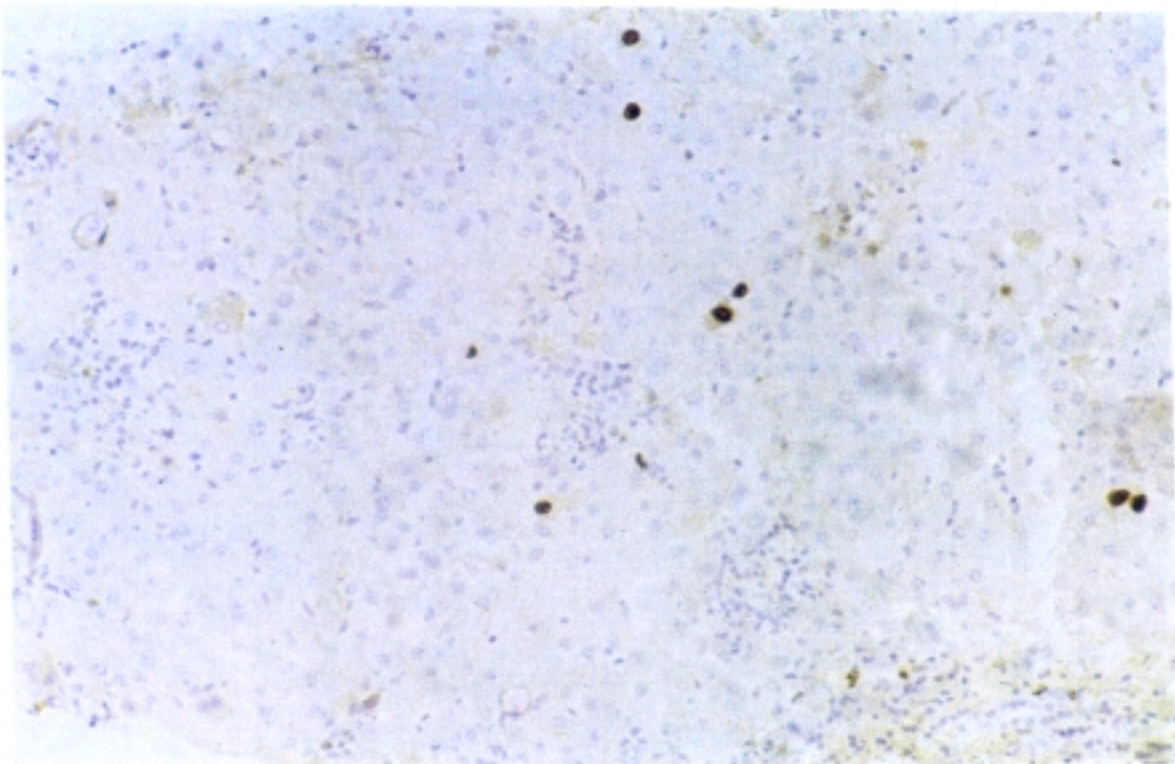


FIGURA 18. Inmunohistoquímica- Positividad de numerosos hepatocitos infectados en un mismo cilindro.

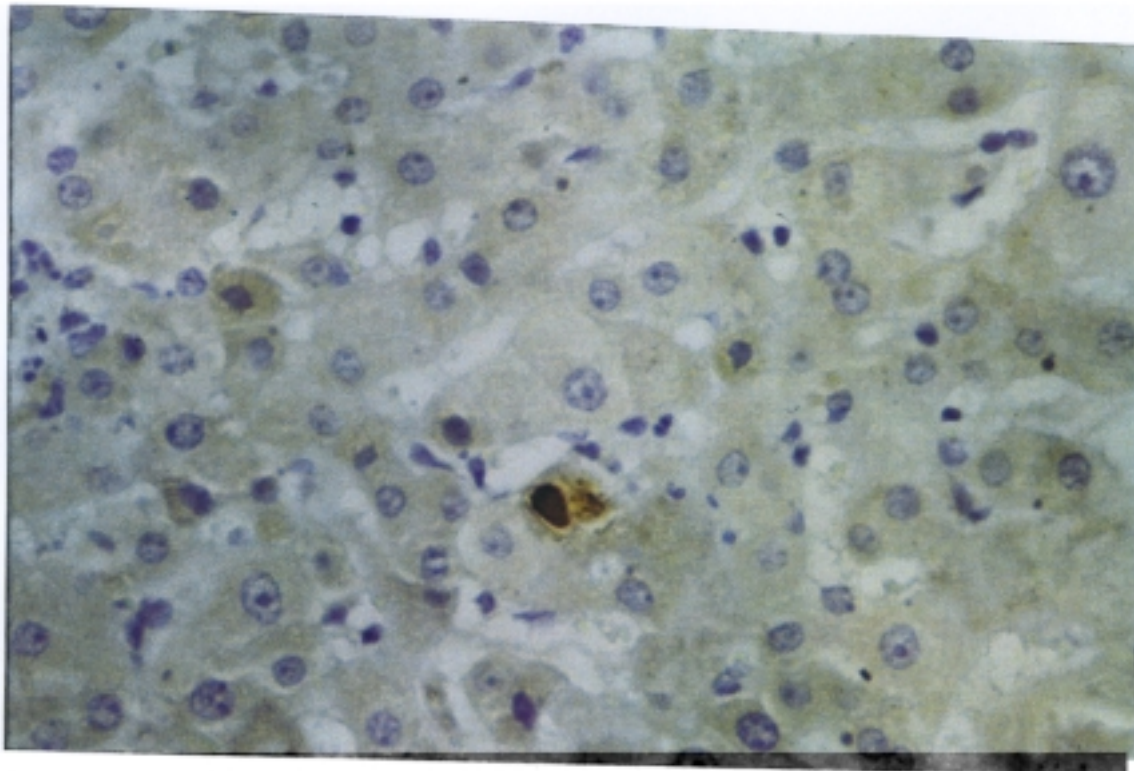


FIGURA 19. Hibridación in situ- Positividad nuclear y citoplasmática de hepatocito citomegálico sin reacción inflamatoria.

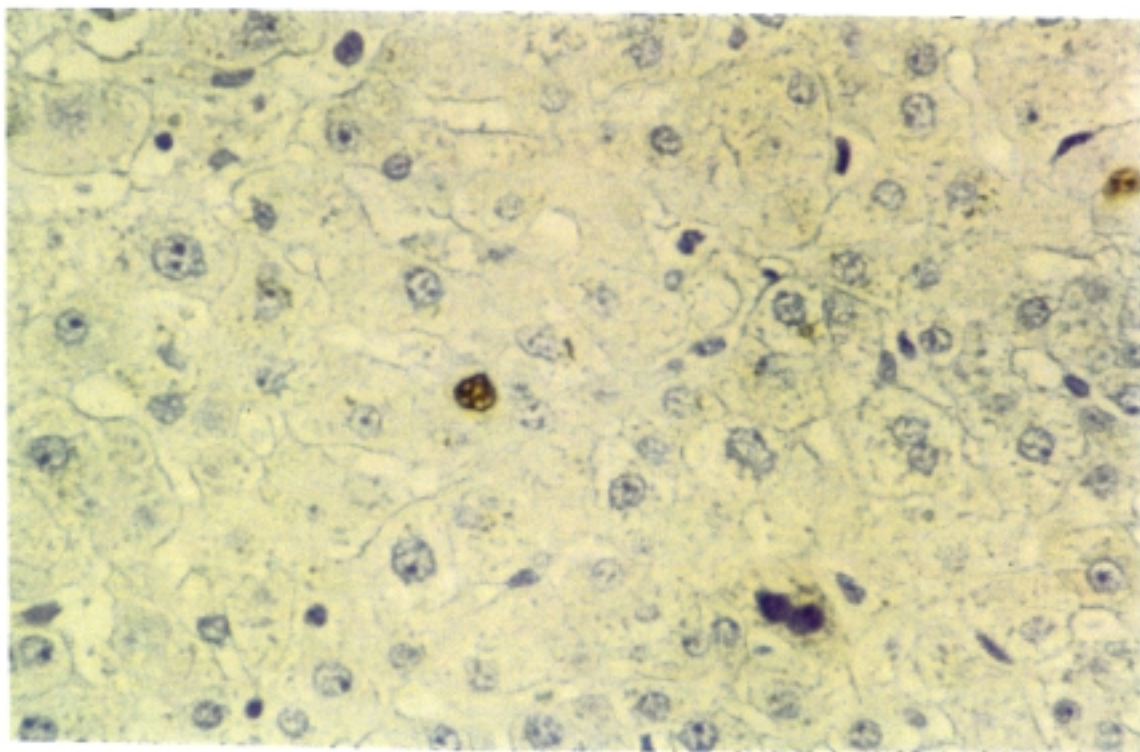


FIGURA 20. Hibridación in situ- Positividad nuclear en hepatocito de morfología normal.

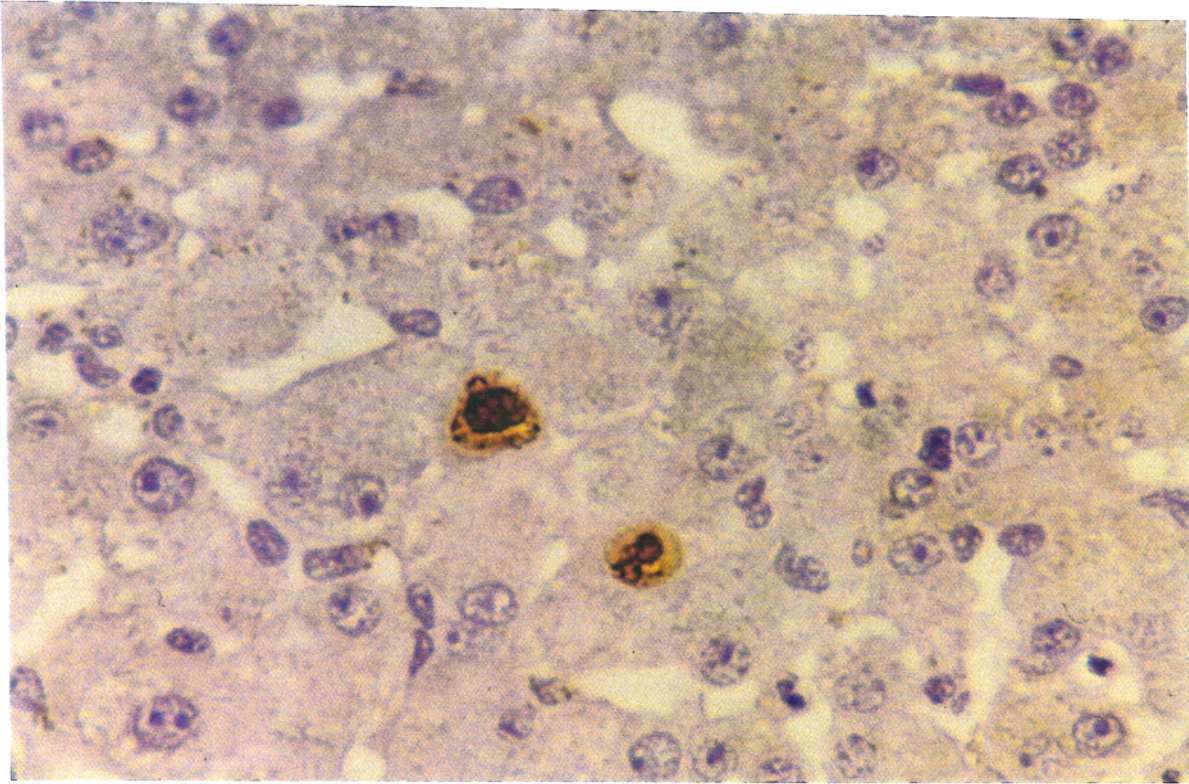


FIGURA 21. Hibridación in situ- Positividad celular en hepatocito citomegálico y de morfología normal.

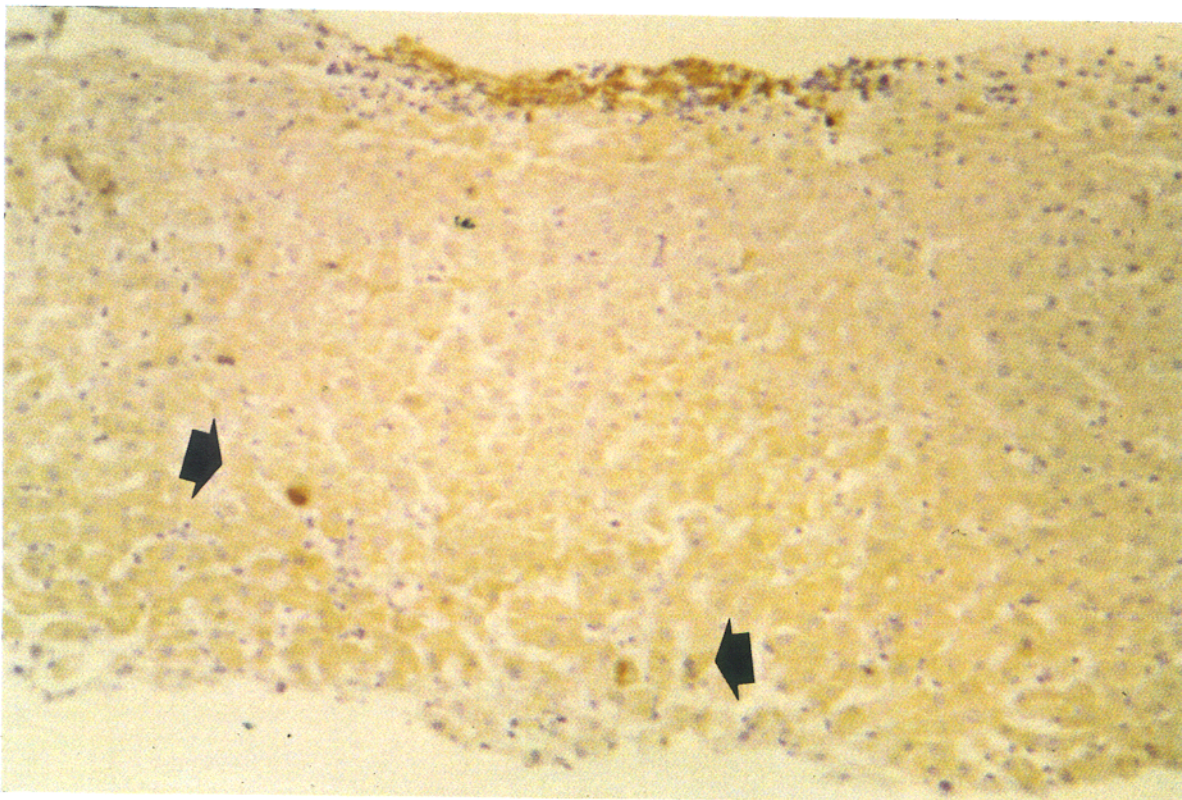


FIGURA 22. Hibridación in situ- Cilindro hepático con escasa cantidad de células positivas.

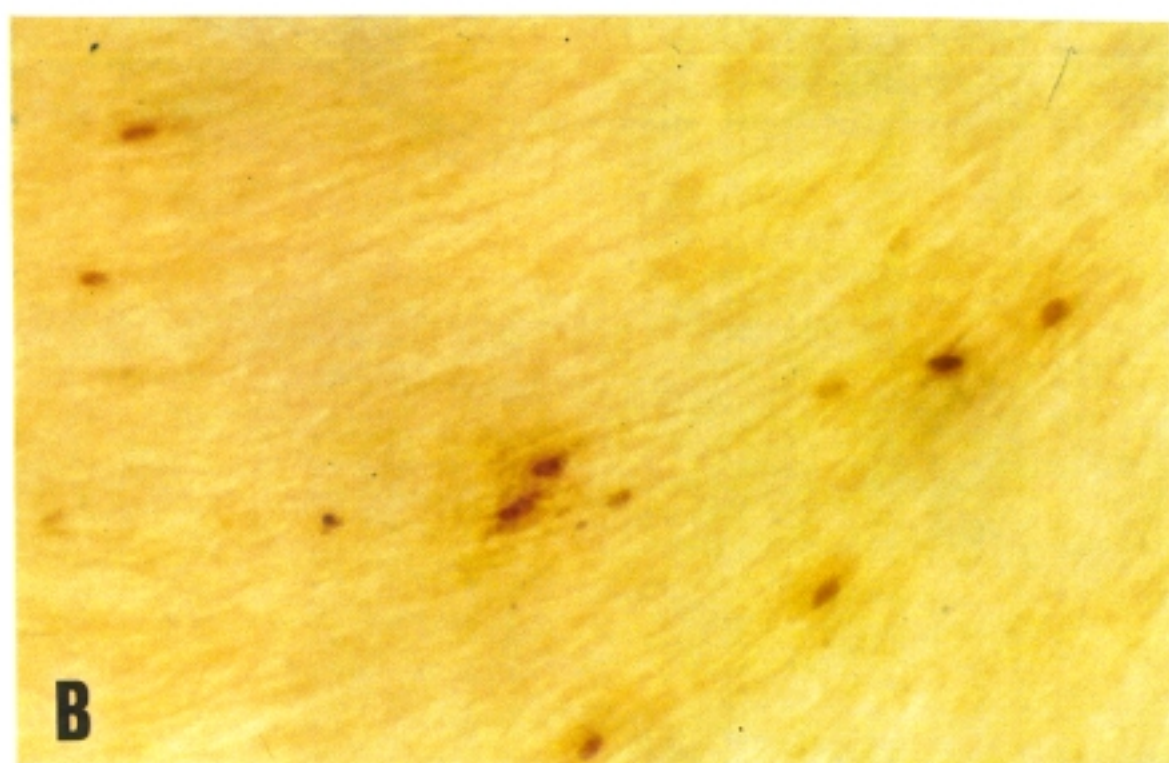
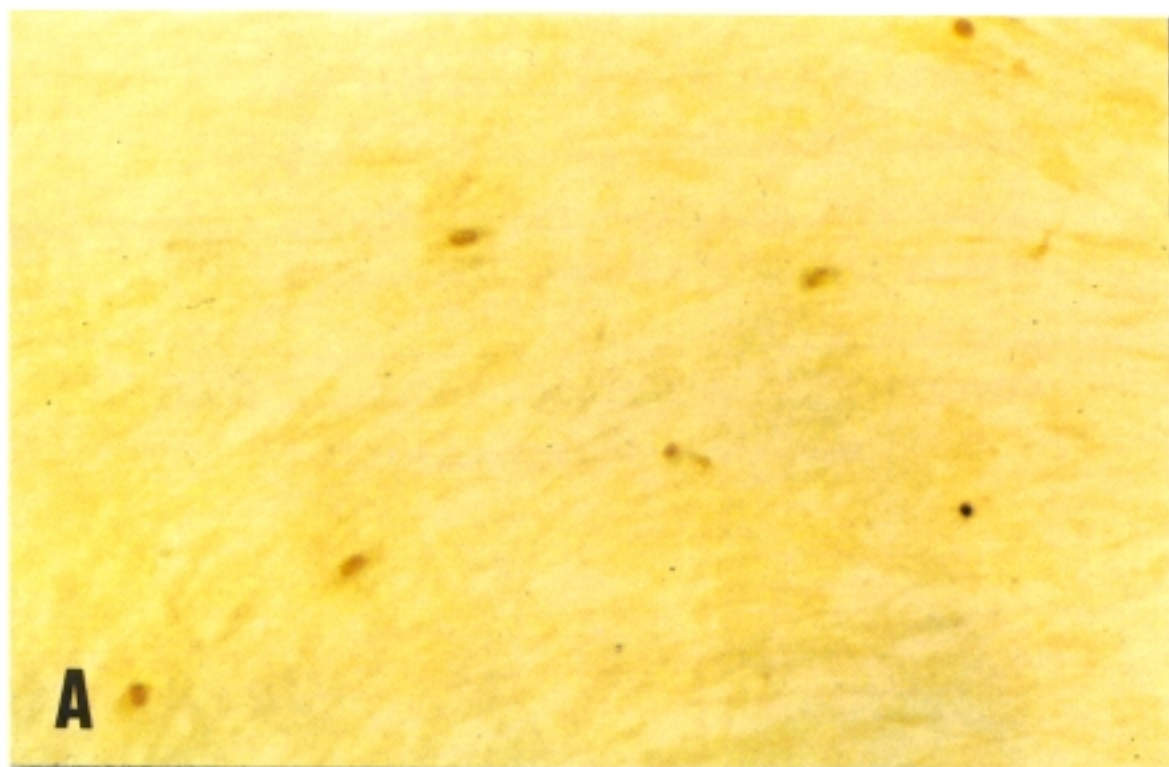


FIGURA 23. Inmunoperoxidasa utilizando el anticuerpo ant-CMV (Dako) sobre fibroblastos humanos infectados a las 24 horas (A) y a las 48 horas (B).

BIBLIOGRAFIA

1. **Adams DH y Neuberger JM.** Patterns of graft rejection following liver transplantation. *J.Hepatol.* 10:113-119,1990.
2. **Aguado JM, Lumbreras C, Otero JR.** Profilaxis de la infección por citomegalovirus en el paciente trasplantado. *Med.Clin. (Barc)*, 99:430-434,1992.
3. **Alford CA, Stagno S, Pass RF, Britt WJ.** Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Rev.Infect.Dis.* 12(S7):745-753,1990.
4. **Almirante BG, Pahissa AB.** El clínico ante las infecciones por citomegalovirus. *Med.Clin. (Barc)* 95:380-384, 1990.
5. **Arnold JC, Gmelin K, Otto G et al.** Effect of cytomegalovirus infection on expression of HLA-Antigens in liver allografts. *Transpl.Proc.* 23:442-443,1991.
6. **Arnold JC, Portman BC, O'Grady JG et al.** Cytomegalovirus infection persists in the liver graft in the vanishing bile duct syndrome. *Hepatology*, 16:285-292,1992.
7. **Artieda P, Cour MI, Ortega P et al.** Citomegalovirus: prevalencia de anticuerpos en grupo control. *Rev.Clín. Esp.* 179:8-11,1986.
8. **Badosa F, Rafecas A, Casanovas MT et al.** El trasplante hepático en la hepatitis fulminante. *Med.Clín.(Barc)* 91:584-585,1988.
9. **Balfour HHJr.** Cytomegalovirus.The troll of transplantation. *Arch.Intern.Med.* 139:279-280,1979.
10. **Balfour HHJr.** Management of cytomegalovirus disease with antiviral drugs. *Rev.Infec.Dis.* 12(S-7):849-860,1990.
11. **Barkholt LM, Ericzon BG, Ehrnst A et al.** Cytomegalovirus infections in liver transplant patients: incidence and outcome. *Transp.Proc.* 22:235-237,1990.
12. **Betts RF.** Syndromes of cytomegalovirus infection. *Adv.Int.Med.* 26:447,1980.
13. **BMDP Statical software manual.** Ed. University of California Press. vol.2,1990.

14. **Bonkowsky HL, Lee RV, Klatskin G.** Acute granulomatous hepatitis. Occurrence in cytomegalovirus mononucleosis. *JAMA*, 233:1284-1288, 1975.
15. **Brainard JA, Greenson JK, Tesi RJ et al.** Detection of cytomegalovirus in liver transplant biopsies using PCR. *Hepatology*, 16:273A, 1992. (abstract)
16. **Breinig MK, Zitelli B, Starzl TE and Ho M.** Epstein-Barr virus, cytomegalovirus and other viral infections in children after liver transplantation. *J. Infec. Dis.* 156:273-279, 1987.
17. **Brigati DJ, Myerson D, Leary JJ et al.** Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin-embedded tissue sections using biotin-labeled hybridization probes. *Virology* 126:32-50, 1983.
18. **Bronsther O, Makowka L, Jaffe R, et al.** Occurrence of cytomegalovirus hepatitis in liver transplant patients. *J. Med. Virol.* 24:423-434, 1988.
19. **Calicó I, Aguilar M, Español Boren T et al.** La enfermedad de las inclusiones citomegálicas en los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Med. Clin. (Barc)* 89:641-644, 1987.
20. **Calicó I, Arcalís L.** Citomegalovirus. Problemática actual. *Med. Clin. (Barc)* 90:246-248, 1988.
21. **Calne RY, Rolles K, White DJG et al.** Cyclosporine A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidney, 2 pancreas and 2 livers. *Lancet* 2:1033-1036, 1979.
22. **Calne RY.** Diagnosis of rejection. In: *Liver Transplantation*. Ed. Calne RY; Grune & Stratton. cap. 26: 301-303, 1987.
23. **Castaldo P, Stratta RJ, Wood P et al.** Clinical spectrum of fungal infections after orthotopic liver transplantation. *Arch. Surg.* 126:149-156, 1991.
24. **Chang MH, Huang HH, Huang ES et al.** Polymerase chain reaction to detect human cytomegalovirus in livers of

- infants with neonatal hepatitis. *Gastroenterology*, 103: 1022-1025, 1992.
25. **Cheeseman SH, Rubin RH, Stewart JA et al.** Controlled clinical trial of prophylactic human leukocyte interferon in renal transplantation. Effect on cytomegalovirus and herpes simplex virus infections. *N.Engl.J.Med.* 300:1345-1349, 1979.
 26. **Chen YT, Mercer GO, Cheigh JS et al.** Cytomegalovirus infection of renal allografts. Detection by Polymerase Chain Reaction. *Transplantation*, 53:99- 102, 1992.
 27. **Chou S.** Acquisition of donor strains of cytomegalovirus by renal transplant recipients. *N.Engl.J.Med.* 314:1418-1423, 1986.
 28. **Cienfuegos JA, Pardo F, Jara P et al.** Organización y requisitos de un programa de trasplante hepático. *Gastroenterol. y Hepatol.* 12:208-214, 1989.
 29. **Cohen JI, Corey GR.** Cytomegalovirus infection in the normal host. *Medicine (Baltimore)*, 64:100-114, 1985.
 30. **Colina F.** Patología y trasplante hepático: diagnóstico anatomopatológico del rechazo. *Patologia* 21:147-156, 1988.
 31. **Colina F, Mollejo M, Moreno E et al.** Effectiveness of histopathological diagnosis in dysfunction of hepatic transplantation. *Arch.Pathol.Lab.Med.* 115:998-1004, 1991.
 32. **Colina F, Mollejo M, Alberti N et al.** Histopatología y trasplante hepático. *Gastroenterol. y Hepatol.* 15:108-114, 1992.
 33. **Colina F.** The role of histopathology in hepatic transplantation. *Sem.Diag.Pathol.* 9:200-209, 1992.
 34. **Colonna JO, Winston DJ, Brill JE et al.** Infections complications in liver transplantation. *Arch.Surg.* 123:360-364, 1988.
 35. **Collet D.** Modelling binary data. Ed.Chapman & Hall, London.cap.7:277-282, 1991.
 36. **Cowdry EV.** The problem of intranuclear inclusions in virus diseases. *Arch.Pathol.* 18:527-542, 1934.

37. **Cox F, Hughes WT.** Cytomegaloviremia in children with acute lymphocytic leukemia. *J.Pediatris* 87:190-194,1975.
38. **Cuervas-Mons V, Garrido A, Barrios C et al.** Analysis of cytomegalovirus reactivation after liver transplantation in cytomegalovirus immunoglobulin G antibody seropositive patients prior to transplantation. *Transpl.Proc.* 22:1798-1799,1990.
39. **Degott C.** Intérêt de l'immunohistochimie dans le diagnostic précoce de l'hépatite cytomégalo virus après transplantation hépatique. *Ann.Pathol.* 10:295-296,1990.
40. **Delgado R, Lumbreras C, Alba C, et al.** Low predictive value of polymerase chain reaction for diagnosis of cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. *J.Clin.Microbiol.* 30:1876-1878,1992.
41. **Demetris AJ, Lasky S, Van Thiel D et al.** Pathology of hepatic transplantation. A review of 62 adult allograft recipients immunosuppressed with a cyclosporine/steroid regimen. *Am.J.Pathol.* 118:151,161,1985.
42. **Demetris AJ, Kakizoe S, Oguma S.** Pathology of liver transplantation. In: *Hepatic Transplantation*, cap5:61-11. Ed.W.B.Saunders Company,1990.
43. **Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM et al.** Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J.Infect.Dis.* 158:1177-1184,1988.
44. **Donalson PT, O'Grady J, Portmann B, et al.** Evidence for an immune response to HLA class I antigens in the vanishing bile duct syndrome after liver transplantation. *Lancet* 1:945-948,1987.
45. **Drew WL.** Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *J.Infect.Dis.* 158:449-456,1988.
46. **Drew WL.** Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *Clin.Infect.Dis.* 14:608-615,1992.
47. **Dummer JS, White LT, Ho M et al.** Morbidity of cytomegalovirus infection in recipients of heart or

- heart-lung transplants who received cyclosporine. *J.Infect.Dis.* 152:1182-1191,1985.
48. **Dummer JS.** Cytomegalovirus infection after liver transplantation: clinical manifestations and strategies for prevention. *Rev.Infect.Dis.* 12(S-7):767-775,1990.
 49. **Dunn DL, Mayoral JL, Gillingham KJ et al.** Treatment of invasive cytomegalovirus disease in solid organ trasplant patients with ganciclovir. *Transplantation* 51:98-106,1991.
 50. **Dussaix E, Wood C.** Cytomegalovirus infection in pediatric liver recipients: A virological survey and prophylaxis with CMV immunoglobulin and early DHPG treatment. *Transplantation* 48:272-274,1989.
 51. **Duvall CP, Casazza AR, Grimley PH et al.** Recovery of cytomegalovirus from adults with neoplastic disease. *Ann.Intern.Med.* 64:531-541,1966.
 52. **Eisenstein BI.** The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N.Engl.J.Med.* 18:178-183,1990.
 53. **Escorsell A, Navasa M, Casafont F et al.** Enfermedad por citomegalovirus (CMV) en el trasplante hepático: incidencia, características y factores predictivos. *Gastroenterol. y Hepatol.* 15:256,1992.(abstract)
 54. **Espy MJ, Paya CM, Holley KE et al.** Diagnosis of cytomegalovirus hepatitis by histopathology and in situ hybridization in liver transplantation. *Diagn. Microbiol. Infect.Dis.* 14:193-296,1991.
 55. **Esteban R, Guardia J.** Situación actual del trasplante hepático. *Gastroenterol. y Hepatol.* 12:147-149,1989.
 56. **Fassbinder W, Ernst W, Hanke P et al.** Cytomegalovirus infections after renal transplantation: effect of a profilactic hyperimmunoglobulin. *Transpl.Proc.* 18:1393-1396,1986.
 57. **Fetterman GH.** A new laboratory aid in the clinical diagnosis of inclusion disease of infancy. *Am.J.Clin.Pathol.* 22:424-425,1952.

58. **Finegold MJ, Carpenter RJ.** Obliterative cholangitis due to cytomegalovirus: a possible precursor of paucity of intra-hepatic bile ducts. *Hum.Pathol.* 13:662-665,1982.
59. **Foegh ML.** Chronic rejection. graft arteriosclerosis. *Transpl.Proc.* 22:119-122,1990.
60. **Forbes BA.** Acquisition of cytomegalovirus infection: an update. *Clin.Microbiol.Rev.* 2:204-216,1989.
61. **Fornés L, Torres M, Rodríguez E, Martínez JA.** Hepatitis aguda por citomegalovirus en un adulto previamente sano. *Gastroenterol. y Hepatol.* 13:96-97,1990.
62. **Foster PF, Williams JW.** Early postoperative care. In: *Hepatic Transplantation.* Ed.W.B.Saunders Company, cap.7:137-162,1990.
63. **Fox AS, Tolpin MD, Whittington PF et al.** Prospective surveillance for cytomegalovirus (CMV) in liver transplant recipients. *Hepatology* 7:1051,1987. (abstract)
64. **Georgii A, Wonigeit K, Worch KJ et al.** Infection after orthotopic grafting of liver. *Transp.Proc.* 18 Sup.4:146-148,1986.
65. **Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA et al.** Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *J.Clin. Microbiol.* 19:917-919,1984.
66. **Gómez SR, Moreno GE, García GI et al.** Resultados del trasplante hepático utilizando donantes de más de 50 años.Comparación con otros grupos de edad. *Rev.Esp.Enf. Digest.* 83:1-8,1993.
67. **Goodpasture EW.** Intracellular inclusions in experimental herpetic lesions of rabbits. *Am.J.Pathol.* 1:1-9,1925.
68. **Gorensek MJ, Stewart RW, Keys TF et al.** Symptomatic cytomegalovirus infection as a significant risk factor for major infections after cardiac transplantation. *J.Infect.Dis.* 158:884-887,1988.
69. **Gorensek MJ, Carey WD, Vogt D et al.** A multivariate analysis of risk factors for cytomegalovirus infection in

- liver transplant recipients. *Gastroenterology* 98:1326-1332, 1990.
70. **Gottesdiener KM.** Transplanted infections: donor-to-host transmission with the allograft. *Ann.Intern.Med.* 110:1001-1016, 1989.
71. **Goudie RB.** DNA technology in histopathology. In: *Recent Advances in Histopathology*. Ed. Churchill Livingstone, 14 cap.1:1-21, 1989.
72. **Griffiths PD, Stirk PR, Ganczakowski M et al.** Rapid diagnosis of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients by detection of early antigen fluorescent foci. *Lancet* ii:1242-1245, 1984.
73. **Griffiths PD, Grundy JE.** Molecular biology and immunology of cytomegalovirus. *Biochem.J.* 241:313-324, 1987.
74. **Griffiths PD, Grundy JE.** The status of CMV as a human pathogen. *Epidemiol.Inf.* 100:1-15, 1988.
75. **Grody WW, Cheng L, Lewin KJ.** In situ viral DNA hybridization in diagnostic surgical pathology. *Hum. Pathol.* 18:535-543, 1987.
76. **Grundy JE, Super M, Sweny P et al.** Symptomatic cytomegalovirus infection in seropositive kidney recipients: Reinfection with donor virus rather than reactivation of recipient virus. *Lancet*, 2:132-135, 1988.
77. **Grundy JE, Ayles HM, McKeating JA et al.** Enhancement of class I HLA antigen Expression by cytomegalovirus: Role in amplification of virus infection. *J.Med.Virol.* 25:483-495, 1988.
78. **Grundy JE.** Virologic and Pathogenetic aspects of cytomegalovirus of infection. *Rev.Infect.Dis.* 12(S7): 711-719, 1990.
79. **Haagsma EB, Klompaker IJ, Grond J et al.** Herpes Virus Infections after orthotopic liver transplantation. *Transpl.Proc.* 19:4054-4056, 1987.
80. **Hermans PE y Cockeril FR.** Antiviral Agents. *Mayo Clin.Proc.* 62:1108-1115, 1987.

81. **Hirsch MS, Schooley RT, Cosimi B et al.** Effects of interferon-alpha on cytomegalovirus reactivation syndromes in renal-transplant recipients. *N.Engl.J.Med.* 308:1489-1494,1983.
82. **Ho M.** Epidemiology of cytomegalovirus infections. *Rev.Infect.Dis.* 12:(S-7)701-710,1990.
83. **Ho M.** History of cytomegalovirus. In: *Cytomegalovirus. Biology and Infection*. Ed. Ho M; Plenum Medical, NY. cap.1:1-6,1991.
84. **Ho M.** Characteristics of cytomegalovirus. In: *Cytomegalovirus. Biology and Infection*. Ed. Ho M; Plenum Medical, NY. cap.4:57-73,1991.
85. **Ho M.** Variants of human cytomegalovirus. In: *Cytomegalovirus. Biology and Infection*. Ed. Ho M; Plenum Medical, NY. cap.8:145-153,1991.
86. **Ho M.** Pathology of cytomegalovirus infection. In: *Cytomegalovirus. Biology and Infection*. Ed. Ho M; Plenum Medical, NY. cap.10:189-204,1991.
87. **Ho M.** Congenital and perinatal human cytomegalovirus infections. In: *Cytomegalovirus. Biology and Infection*. Ed. Ho, M; Plenum Medical, NY. cap.11:205-227,1991.
88. **Ho M.** Human cytomegalovirus infections in immunosuppressed patients. In: *Cytomegalovirus. Biology and Infection*. Ed. Ho, M; Plenum Medical, NY. cap.13:249-300,1991.
89. **Ho M.** Cytomegalovirus infection and indirect sequelae in immunocompromised transplant patient. *Transpl.Proc.* 23(2-S1): 2-7,1991.
90. **Hobbs KEF.** Liver transplantation. A review. *J.Hepatol.* 4:148-153,1987.
91. **Höckerstedt K.** Liver transplantation today. *Scand.J. Gastroenterol.* 25:1-10,1990.
92. **Horwitz CA, Henle W, Henle G. et al.** Clinical and laboratory evaluation of cytomegalovirus-induced mononucleosis in previously healthy individuals. Report of 82 cases. *Medicine* 65:124-134,1986.

93. **Hsu SM, Raine L, Fanger H.** Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in Immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J.Histochem.Cytochem.* 29:577-580,1981.
94. **Hubscher SG, Buckels JA, Elias E et al.** Vanishing bile-duct syndrome following liver transplantation - is it reversible? *Transplantation* 51:1004-1010,1991.
95. **Jara P, Díaz MC, De la Vega A et al.** Ganciclovir prophylaxis of cytomegalovirus infection in pediatric patients undergoing liver transplantation: preliminary results. *Trasplante* 1:63-68,1990.
96. **Jespersen DJ, Drew WL, Gleaves CA et al.** Multisite evaluation of a monoclonal antibody reagent (Syva) for rapid diagnosis of cytomegalovirus in the shell vial assay. *J.Clin. Microbiol.* 27:1502-1505,1988.
97. **Johnson PC, Lewis RM, Golden DL et al.** The impact of cytomegalovirus infection on seronegative recipients of seropositive donor kidneys versus seropositive recipients treated with cyclosporine-prednisone immunosuppression. *Transplantation* 45:116-121,1988.
98. **Jucá N, Colina F, Ballestin C et al.** A comparative analysis of the utility of histological and immunohistochemical studies of the liver tissue in the diagnosis of cytomegalovirus hepatitis in liver transplant. *Transplantology (Madrid)* 3:39-43,1992.
99. **Kahan BD, Landers TA.** Rapid detection of cytomegalovirus infection using a DNA probe. *Transpl.Proc.* 17:989-992,1985.
100. **Keh WC y Gerber MA.** In situ hybridization for cytomegalovirus DNA in AIDS patients. *Am.J.Pathol.* 131:490-496,1988.
101. **King SM, Petric M, Superina R et al.** Cytomegalovirus infections in pediatric liver transplantation. *AJDC* 144: 1307-1310,1990.

102. **Koneru B, Jaffe R, Esquivel CO et al.** Adenoviral infections in pediatric liver transplant recipients. *JAMA* 258:489-492,1987.
103. **Kosai KI, Kage M, Kojiro M.** Clinicopathological study of liver involvement in cytomegalovirus infection in infant autopsy cases. *J.Gastroenterol.Hepatol.* 6:603-608,1991.
104. **Kusne S, Dummer JS, Singh N et al.** Infections after liver transplantation: an analysis of 101 consecutive cases. *Medicine* 67:132-143,1988.
105. **Kusne S, Schwartz M, Breinig MK et al.** Herpes simplex virus hepatitis after solid organ transplantation in adults. *J.Infect.Dis.* 163:1001-1007,1991.
106. **Lang DJ, Ebert PA, Rodgers BM et al.** Reductions of post-perfusion cytomegalovirus infection following the use of leucocytedepleted blood. *Transfusion* 17:391-395,1977.
107. **Lobdell DH.** "Ring" granulomas in cytomegalovirus hepatitis. *Arch.Pathol.Lab.Med.* 111:881-882,1987.
108. **Lones MA, Shintaku IP, Weiss LM et al.** Epstein-Barr virus in liver biopsies after liver transplantation: three methods compared. *Hepatology* 16:282A,1992. (abstract)
109. **Lumbreras C, Otero JR, Aguado JM et al.** Estudio prospectivo de la infección por citomegalovirus en receptores de trasplante hepático. *Med.Clin.(Barc)* 99:401-405,1992.
110. **Lumbreras C.** Complicaciones infecciosas en el trasplante de órgano sólido. *Rev.Esp.Traspl.* 1:189-193,1992.
111. **Macasaet FF, Holley KE, Smith TF, Keys TF.** Cytomegalovirus studies of autopsy tissue. Incidence of inclusion bodies and related pathologic data. *Am.J.Clin.Pathol.* 63:859-865,1975.
112. **Macher AM, Reichert CM, Strauss SE et al.** Death in the AIDS patients: role of cytomegalovirus. *N.Engl.J.Med.* 309:1454,1983.
113. **Maddrey WC, Friedman LS, Munoz SJ, Hahn EG.** Selection of the patient for liver transplantation and timing of

- surgery. In: Maddrey WC ed. Transplantation of the liver. NY, Elsevier. 23-58, 1988.
114. Maddrey WC, Van Thiel DH. Liver transplantation: an overview. Hepatology 8:948-959, 1988.
115. Malatack JJ, Gartner JC, Urbach AH, Zitelli BJ. Orthotopic liver transplantation, Epstein-Barr virus, cyclosporine, and lymphoproliferative growing concern. J. Pediatric. 118:667-675, 1991.
116. Margarit C, Jaurrieta E, Casais L et al. Trasplante hepático ortotópico: primer año de experiencia. Med. Clin. (Barc) 87:397-402, 1986.
117. Markin RS, Langnas AN, Donovan JP et al. Opportunistic viral hepatitis in liver transplant recipients. Transpl. Proc. 23:1520-1521, 1991.
118. Masih AS, Linder J, Shaw BW et al. Rapid identification of cytomegalovirus in liver allograft biopsies by in situ hybridization. Am. J. Surg. Pathol. 12:362-367, 1988.
119. Matilla A, Diaz-Cano S. Infecciones víricas. In: Anatomía Patológica. Ed. Fariña J; Salvat, Barc. cap. 28:279-300, 1990.
120. Megison SM, Andrews WS. Combination therapy with ganciclovir and intravenous IgG for cytomegalovirus infections in pediatric liver transplant recipients. Transplantation 52:151-154, 1991.
121. Merigan TC, Resta S. Cytomegalovirus: Where have we been and where are we going? Rev. Infect. Dis. 12:S693-S698, 1990.
122. Meyers JD, McGuffin RW, Neiman PE et al. Toxicity and efficacy of human leucocyte interferon for treatment of cytomegalovirus pneumonia after marrow transplantation. J. Infect. Dis. 141:555-562, 1980.
123. Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED. Risk factor for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. J. Infect. Dis. 153:478-488, 1986.

124. **Meyers JD.** Prevention of cytomegalovirus infection after marrow transplantation. *Rev.Infect.Dis.* 11:1691-1705,1989.
125. **Meyers JD, Ljungman P, Fisher LD.** Cytomegalovirus excretion as a predictor of cytomegalovirus disease after marrow transplantation: importance of cytomegalovirus viremia. *J.Infect.Dis.* 162:373-380,1990.
126. **Millet R, Tomita T, Marshall HE et al.** Cytomegalovirus endomyocarditis in a transplanted heart. A case report with in situ hybridization. *Arch.Pathol.Lab.Med.* 115:511-515,1991.
127. **Minder WH.** Die ätiologie der cytomegalia infantium. *Med. Wochenschr.* 83:1180-1182,1953.
128. **Moreno E, Landa I, Calleja J et al.** Resultados del homotrasplante ortotópico clínico. *Gastroenterol. y Hepatol.* 12:192-201,1989.
129. **Moreno E, García I, Gonzalez I et al.** Trasplante hepático ortotópico: resultados del Hospital 12 de Octubre. *Rev.Esp. Enf.Dig.* 78:295-302,1990.
130. **Moreno EG, Garcia IG, González Pinto I et al.** Results of orthotopic liver transplantation: A personal experience. *Hepato-Gastroenterol.* 39:405-412,1992.
131. **Myerson D, Hackman RC, Nelson JA et al.** Widespread presence of histologically occult cytomegalovirus. *Hum.Pathol.* 15:430-439,1984.
132. **Naoumov NV, Alexander GJ, Eddleston ALW, William R.** In situ hybridisation in formalin fixed, paraffin wax embedded liver specimens: method for detecting human and viral DNA using biotinylated probes. *J.Clin.Pathol.* 41:793-798,1988.
133. **Naoumov NV, O'Grady JG, Portmann BC et al.** Rapid diagnosis of cytomegalovirus infection by in situ hybridization in liver grafts. *Lancet* 18:1361-1364,1988.
134. **Neuberger J y Williams R.** Indications and assessment for liver grafting. In: *Liver Transplantation.* Ed.Calne R. Grune & Stratton. cap.7:63-75,1987.

135. **Niedobitek G, Finn T, Herbst H et al.** Detection of cytomegalovirus by in situ hybridisation and immunohistochemistry using new monoclonal antibody CCH2: a comparison of methods. *J.Clin.Pathol.* 41:1005-1009,1988.
136. **O'Grady JG, Sutherland S, Alexander GJM et al.** Relationship of CMV infection to chronic rejection following liver transplantation. *Hepatology* 7:1050,1987.
137. **O'Grady JG, Alexander GJM, Sutherland S et al.** Cytomegalovirus infection and donor/recipient HLA antigens: Interdependent co-factors in pathogenesis of vanishing bileduct syndrome after liver transplantation. *Lancet* 6(2-8606):302-305,1988.
138. **Oguma S, Belle S, Starzl TE, Demetris AJ.** A histometric analysis of chronically rejected human liver allografts: Insights into the mechanisms of bile duct loss: direct immunologic and ischemic factors. *Hepatology* 9:204-209,1989.
139. **Onorato IM, Morens DM, Martone WJ, Stansfield SK.** Epidemiology of cytomegalovirus infections: recommendations for prevention and control. *Rev.Infect. Dis.* 7:479-497,1985.
140. **Orellana MA, Santacruz MS, Aramendi M et al.** Prevalencia de anticuerpos frente a cytomegalovirus y virus herpes simples en la zona suroeste de Madrid. *Rev.Esp. Microbiol.Clin.* 6:488-490,1991.
141. **Ou CY, Mitchell SW, Krebs J et al.** DNA amplification for direct detection of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) in DNA of peripheral mononuclear cells. *Science* 239:295-297,1987.
142. **Pass RF, Griffiths PD, August AM.** Antibody response to cytomegalovirus after renal transplantation: comparison of patients with primary and recurrent infections. *J.Infect.Dis.* 147:40-46,1983.

143. Pass RF, Fowler KB, Boppana S. Clinical importance of cytomegalovirus infection: an overview. In: Progress in cytomegalovirus research. Ed. Landini MP; pag:3-10,1991.
144. Paya CV, Wold AD, Smith TF. Detection of cytomegalovirus infections in specimens other than urine by the shell vial assay and conventional tube cell cultures. J.Clin.Microbiol. 25:755-757,1987.
145. Paya CV, Hermans PE, Smith TF et al. Efficacy of ganciclovir in liver and kidney transplant recipients with severe cytomegalovirus infection. Transplantation 46:229-234,1988.
146. Paya CV, Wiesner RH, Hermans PE et al. A prospective study of incidence and relationship of CMV infection and hepatic allograft rejection following liver transplantation. Hepatology 8:1248,1988.(abstract)
147. Paya CV, Hermans PE, Wiesner RH et al. Cytomegalovirus hepatitis in liver transplantation: Prospective analysis of 93 consecutive orthotopic liver transplantations. J.Infect.Dis. 160:752-758,1988.
148. Paya CV, Hermans PE, Washington JA et al. Incidence, distribution and outcome of episodes of infection in 100 orthotopic liver transplantations. Mayo Clin.Proc. 64:555-564,1989.
149. Paya CV, Smith TF, Ludwig J, Hermans PE. Rapid shell vial culture and tissue histology compared with serology for the rapid diagnosis of cytomegalovirus infection in liver transplantation. Mayo Clin.Proc. 64:670-675,1989.
150. Paya CV, Holley KE, Wiesner RH et al. Early diagnosis of cytomegalovirus hepatitis in liver transplant recipients: Role of immunostaining, DNA hybridization and culture of hepatic tissue. Hepatology 12:119-126,1990.
151. Paya CV, Wiesner RH, Hermans PE et al. Lack of association between cytomegalovirus infection, HLA matching and the vanishing bile duct syndrome after liver transplantation. Hepatology 16:66-70,1992.

-
152. **Peleman RR, Gevalier JS, Van Thiel DV et al.** Orthotopic liver transplantation for acute and subacute hepatic failure in adults. *Hepatology* 7:484-489,1987.
 153. **Persons DL, Moore JA, Fishback JL.** Comparison of polymerase chain reaction, DNA hibridization, and histology with viral culture to detect cytomegalovirus in immunosuppressed patients. *Mod.Pathol.* 4:149-153,1991.
 154. **Pillay d, Charman H, Burroughs AK et al.** Surveillance for CMV infection in orthotopic liver transplant recipients. *Transplantation* 53:1261-1265,1992.
 155. **Pirsch JD, Armbrust MJ, Stratta RJ et al.** Perioperative Infection in liver transplant recipients under a quadruple immunosuppressive protocol. *Transpl.Proc.* 21:3559,1989.
 156. **Plotkin SA, Farpuhar J, Hornberger E.** Clinical trials of immunization with the Towne 125 strain of human cytomegalovirus. *J.Infect.Dis.* 134:470-475,1976.
 157. **Portmann B, MacSween RNM.** Diaseases of the intrahepatic bile ducts. In: *Pathology of the liver.* Ed.MacSween RNM, Anthony PP y Scheuer PJ; Churchill Livingstone. cap.13: 424-453,1987.
 158. **Qadri SM, Al-Ahdal MN, Qadri SG, Khan Y.** Cytomegalovirus detection by biotinylated DNA probes. *Med.Microbiol. Immunol.* 178:135-141,1989.
 159. **Quiroga J, Colina I, Demetris AJ et al.** Cause and timing of first allograft failure in orthotopic liver transplantation: A study of 177 consecutive patients. *Hepatology* 14:1054-1062,1991.
 160. **Rabah R, Jaffe R.** Early detection of cytomegalovirus in the allograft liver biopsy: A comparison of methods. *Pediatric.Pathol.* 7:549-556,1987.
 161. **Rakela J, Wiesner RH, Taswell HP et al.** Incidence of cytomegalovirus infection and its relationship to donor-recipient serologic status in liver transplantation. *Transpl.Proc.* 19:2399-2402,1987.

162. **Rand KH.** Cytomegalovirus: A not so innocent bystander. JAMA, 240(22):2470-2471,1978.
163. **Randhawa PS, Markin RS, Starzl TE, Demetris AJ.** Epstein-Barr virus - Associated syndrome in immunosuppressed liver transplant recipients. Clinical profile and recognition on routine allograft biopsy. Am.J.Surg. Pathol. 14:538-547,1990.
164. **Ray RA, Lewin KJ, Colonna J et al.** The role of liver biopsy in evaluating acute allograft dysfunction following liver transplantation: A clinical histologic correlation of 34 liver transplants. Hum.Pathol. 19:835-848,1988.
165. **Reller LB.** Granulomatous hepatitis associated with acute cytomegalovirus infection. Lancet, 6:20-22,1973.
166. **Reina J, Alomar P.** Aislamiento de citomegalovirus en sangre periférica. Implicaciones biológicas. Rev.Esp.Microbiol. Clin. 3:674-678, 1988.
167. **Rimola A.** Trasplante hepático. Med.Clin. 97:388-394,1991.
168. **Robey SS, Gage WR, Kuhajda FP.** Comparison of immunoperoxidase and DNA in situ hybridization techniques in the diagnosis of cytomegalovirus colitis. Am.J.Clin.Pathol. 89:666-671,1988.
169. **Rogers BB, Alpert LC, Hine EAS y Buffone GJ.** Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the polymerase chain reaction. Am.J.Pathol. 136:541-548,1990.
170. **Rolles K, Williams R, Neuberger J, Calne R.** The Cambridge and King'College Hospital experience of liver transplantation, 1968-1983. Hepatology 4:50-55,1984.
171. **Rowe WP, Hartley JW, Waterman S et al.** Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 92:418-424, 1956.
172. **Rubin RH.** The indirect effects of cytomegalovirus infection on the outcome of organ transplantation. JAMA 261:3607-3609,1989.

173. **Rubin RH.** Impact of cytomegalovirus infection on organ transplant recipients. *Rev.Infect.Dis.* 12:(S-7)754-766,1990.
174. **Ruebner BH y Montgomery CK.** Hepatic lesions in viral infections. In: *Pathology of the liver and biliary tract.* Ed.Silverberg SG;John Willey,NY. cap.3:60-76,1982.
175. **Sacks SL y Freeman HJ.** Cytomegalovirus hepatitis: Evidence for direct hepatic viral infection using monoclonal antibodies. *Gastroenterology* 86:346-350,1984.
176. **Saliba F, Fabiani B, Samuel D et al.** CMV hepatitis: a common cause of graft dysfunction after orthotopic liver transplantation. *J.Hepatol.* 5:559,1987.
177. **Saliba F, Gugenheim J, Samuel D et al.** Incidence of cytomegalovirus infection and effects of cytomegalovirus immunoglobulin prophylaxis after orthotopic liver transplantation. *Transpl.Proc.* 19:4081-4082,1987.
178. **Saliba F, Arulnaden JL, Gugenheim J et al.** CMV hyperimmune globulin prophylaxis after liver transplantation: a prospective randomized controlled study. *Transpl.Proc.* 21:2260-2262,1990.
179. **Salmela K, Höckerstedt K, Lautenschlager I et al.** Ganciclovir in the treatment of severe cytomegalovirus disease in liver transplant patients. *Transpl.Proc.* 22:238-240,1990.
180. **Salt A, Sutehall G, Sargaison M et al.** Viral and *Toxoplasma gondii* infections in children after liver transplantation. *J.Clin.Pathol.* 43:63-67,1990.
181. **Salt A, Noble-Jamieson G, Barnes ND et al.** Liver transplantation in 100 children: Cambridge and King'College Hospital series. *BMJ* 304:416-421,1992.
182. **Schmid R.** Issues in liver transplantation. *Hepatology* 4:S1-S2,1984.
183. **Schooley RT.** Cytomegalovirus in the setting of infection with human immunodeficiency virus. *Rev.Infect.Dis.* 12:(S-7) 811-819,1990.

184. **Shaefer MS, Stratta RJ, Markin RS et al.** Ganciclovir therapy of cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. *Transpl.Proc.* 23:1515-1516,1991.
185. **Sido B, Holfmann WJ, Otto G et al.** Cytomegalovirus infection in liver transplantation: graft infection and clinical relevance. *Transpl.Proc.* 24:2641-2642,1992.
186. **Simson IW y Gear JHS.** Other viral and infections diseases. In: *Pathology of the liver.* Ed.MacSween RNM, Anthony PP y Scheur PJ; Churchill Livingstone. cap.7:224-264,1987.
187. **Singh N, Dummer JS, Kusne S et al.** Infections with cytomegalovirus and other herpes virus in 121 liver transplant recipients: transmission by donated organ and the effect of OKT3 antibodies. *J.Infect.Dis.* 158:124-131,1988.
188. **Smith MG.** Propagation in tissue culture of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 92:424-430, 1956.
189. **Smyth RL, Scott JP, Borysiewicz LK et al.** Cytomegalovirus infection in heart-lung transplant recipients - risk factors, clinical associations and response to treatment. *J.Infect.Dis.* 164:1045-1050,1991.
190. **Snover DC, Horwitz CA.** Liver disease in cytomegalovirus mononucleosis: a light microscopical and immunoperoxidase study of six cases. *Hepatology* 4:408-412,1984.
191. **Snover DC, Sibley RK, Freese DK et al.** Orthotopic liver transplantation: a pathological study of 63 serial liver biopsies from 17 patients with special reference to the diagnostic features and natural history of rejection. *Hepatology* 4:1212-1222,1984.
192. **Snover DC, Hutton S, Balfour HH, Bloomer JR.** Cytomegalovirus infection of the liver in transplant recipients. *J.Clin.Gastroenterol.* 9:659-665,1987.
193. **Snover DC, Freese DK, Sharp HL, et al.** Liver allograft rejection. An analysis of the use of biopsy in

- determining outcome of rejection. Am.J.Surg.Pathol. 11:1-10,1987.
194. **Snover DC**. Viral infections. In:Biopsy diagnosis of liver disease. Ed.Snover DC; Williams&Wilkins (Baltimore). cap.8:127-154,1992.
195. **Snover DC**. The liver biopsy in transplantation. In: Biopsy diagnosis of liver. Ed.Snover DC; Williams & Wilkins (Baltimore). cap.14:217-231,1992.
196. **Snydman DR**. Cytomegalovirus Immunoglobulins in the prevention and treatment of cytomegalovirus disease. Rev.Infect.Dis. 12(S7):839-848,1990.
197. **Spatz A, Tricottet V, Saliba F et al**. Diagnostic rapide des hépatites à cytomégalo virus après transplantation hépatique. Ann.Pathol. 10:331-335,1990.
198. **Spector SA, Rua JA, Spector DH, McMillan R**. Detection of human cytomegalovirus in clinical specimens by DNA-DNA hybridization. J.Infect.Dis. 150:121-126,1984.
199. **Stagno S, Reynolds DW, Tsiantos A et al**. Comparative serial virology and serologic studies of symptomatic and subclinical congenitally and natally acquired cytomegalovirus infections. J.Infect.Dis.132:568-577,1975.
200. **Stagno S, Pass RF, Dworsky ME et al**. Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmission. In: Clinical Obstetrics and Gynecology. Ed.Knox GE; pag:563-576,1982.
201. **Stagno S, Pass RF, Cloud G et al**. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus and clinical outcome. JAMA 256:1904-1908,1986.
202. **Stagno S, Fowler KB, Pass RF et al**. The impact of primary and recurrent maternal cytomegalovirus (CMV) infection in the outcome of congenital infection. In: Progress in cytomegalovirus research. Ed.Landini MP; pag:11-14,1991.
203. **Starzl TE, Marchioro TL, Von Kaulla K et al**. Homotransplantation of the liver in humans. Surg.Gynecol. Obstet. 117:659-676, 1963.

204. **Starzl TE, Koep LJ, Halgrimson CG et al.** Fifteen years of clinical liver transplantation. *Gastroenterology* 77:375-388,1979.
205. **Starzl TE, Iwatsuki S, Shaw BW et al.** Analysis of liver transplantation. *Hepatology* 4:47-49,1984.
206. **Starzl TE, Demetris AJ.** Infectious problems in liver transplantation. In: *Liver Transplantation*:101-108. Ed. Year Book Medical Publishers, INC.1990.
207. **Stein DS, Verano AS, Levandowski RA.** Successful treatment with ganciclovir of disseminated cytomegalovirus infection after liver transplantation. *Am.J.Gastroenterol.* 83:684-686,1988.
208. **Stinski M.** Molecular biology of cytomegalovirus replication. In: *Cytomegalovirus. Biology and Infection.* Ed. Ho M. cap.2:7-35,1991.
209. **Stratta RJ, Shaefer MS, Markin RS et al.** Clinical patterns of cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Arch.Surg.* 124:1443-1450,1989.
210. **Stratta RJ, Wood RP, Langnas AN et al.** Donor selection for orthotopic liver transplantation: lack of an effect of gender or cytomegalovirus status. *Transpl.Proc.* 22:410-413,1990.
211. **Stratta RJ, Shaefer MS, Cushing KA et al.** Successful prophylaxis of cytomegalovirus disease after primary CMV exposure in liver transplant recipients. *Transplantation* 51:90-97,1991.
212. **Stratta RJ, Shaefer MS, Markin RS et al.** Cytomegalovirus infection and disease after liver transplantation. An overview. *Dig.Dis.Sci.* 37:673-688,1992.
213. **Strickler JG, Manivel JC, Copenhaver CM, Kubic VL.** Comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for detection of cytomegalovirus and herpes simplex virus. *Hum.Pathol.* 21:443-448,1990.
214. **Templeton NS.** The polymerase chain reaction. History, methods and application. *Diag.Molec.Pathol.* 1:58-72,1992.

-
215. **Ten Napel CHH, Houthoff HJ, The TH.** Cytomegalovirus hepatitis in normal and immune compromised hosts. *Liver* 4:184-194,1984.
 216. **The TH, Bij W, Berg P et al.** Cytomegalovirus antigenemia. *Rev.Infect.Dis.* 12:(S-7)737-744,1990.
 217. **Theise ND, Thung SN.** Localization of cytomegalovirus antigens in liver allograft over time. *Hum.Pathol.* 24:103-108,1993.
 218. **Toorkey CB, Carrigan DR.** Immunohistochemical detection of an immediate early antigen of human cytomegalovirus in normal tissues. *J.Infect.Dis.* 160:741-751,1989.
 219. **Torné Cachot J, Drobnic L.** Citomegalovirus. *Ann.Med.* (Barc) 73:111-114,1987.
 220. **Tsevat J, Snyderman DR, Pauker SG et al.** Which renal transplant patients should receive cytomegalovirus immunoglobulin? A cost-effectiveness analysis. *Transplantation* 52:259-265,1991.
 221. **Turrión VS, Cuervas-Mons V, Portero F et al.** Estudio prospectivo de la incidencia, significado, factores de riesgo y evolución de la infección por CMV en pacientes con TX hepático, sin profilaxis antivírica. *Gastroenterol. y Hepatol.* 15:275-276,1992.
 222. **Ulrich W, Schleiderer MP, Buxbaum P.** The histopathologic identification of CMV infected cells in biopsies of human renal allografts. An evaluation of 100 transplant biopsies by in situ hybridization. *Pathol.Res.Pract.* 181:739-745,1986.
 223. **Unger ER, Budgeon LR, Myerson D, Brigati DJ.** Viral Diagnosis by in situ hybridization. *Am.J.Surg.Pathol.* 10:1-8,1986.
 224. **Valerdiz S y Pardo Mindán FJ.** Enfermedades infecciosas. In: *Anatomia Patológica General.* Ed.J.Pardo Mindán; Doyma, Barc. cap.9:227-271,1991.
 225. **Van Thiel DH, Gavalier JS, Tarter RE et al.** Past, present and future of liver transplantation. In: Maddrey WC ed, *Transplantation of the liver.* NY, Elsevier. 1-22,1988.

-
226. **Vanstapel MJ y Desmet VJ.** Cytomegalovirus hepatitis: A histological and immunohistochemical study. *Appl.Pathol.* 1:41-49,1983.
227. **Vierling JM y Fennell Jr RH.** Histopathology of early and late human hepatic allograft rejection: Evidence of progressive destruction of interlobular bile ducts. *Hepatology* 5:1076-1082,1985.
228. **Vigouroux C, Moncorgé C, Calmus Y et al.** Infections à cytomégalo virus chez les transplantés hépatiques: détermination de groupes à risque. *Gastroenterol.Clin.Biol.* 16:260-263,1992.
229. **Wajszczuk CP, Dummer JS, Ho M et al.** Fungal infections in liver transplant recipients. *Transplantation* 40:347-353,1985.
230. **Weller TH, Macauley JC, Craig JM, Wirth P.** Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc. Soc.Exp.Biol.Med.* 94:4-12,1957.
231. **Weller TH.** Cytomegalovirus: the difficult years. *J.Infect. Dis.* 122:532-539,1970.
232. **Weller TH.** The cytomegalovirus: ubiquitous agents with protean clinical manifestations. *N.Engl.J.Med.* 285:267-274,1971.
233. **Whreghitt T.** Cytomegalovirus infections in heart and heart-lung transplant recipients. *J.Antimicrob.Chemoth.* 23:49-69,1989.
234. **Wiesner RH, Ludwig J, Van Hoek B et al.** Current concepts in cell-mediated hepatic allograft rejection leading to ductopenia and liver failure. *Hepatology* 14:721-729,1991.
235. **Williams JW, Peters TG, Vera SR et al.** Biopsy-directed immunosuppression following hepatic transplantation in man. *Transplantation* 39:589-596,1985.
236. **Williams JW.** History of liver transplantation. In: *Hepatic Transplantation*, cap 1:3-10, WB Saunders Company,1990.

- 237. Williams R y O'Grady JG. Liver transplantation: results, advances and problems. J. Gastroenterol. Hepatol. S1:110-126, 1990.
- 238. Wright TS. Cytomegalovirus infection and vanishing bile duct syndrome: culprit or innocent bystander? Hepatology 16: 494-496, 1992.
- 239. Wyatt JP, Saxton J, Lee RS, Pinkerton H. Generalized cytomegalic inclusion disease. J. Pediat. 36:271-294, 1950.
- 240. Zaia JA. Pathogenesis of CMV - Associated diseases in 1990. Transpl. Proc. 23(S-3):1-4, 1991.